

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**B-Lactamasas plasmídicas de espectro ampliado en  
Enterobacteriaceae**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Rafael María Canton Moreno**

**Directores**

**Fernando Baquero Mochales**

**Jesús Martínez-Beltrán**

**Madrid**

**ISBN: 978-84-8466-825-1**

**© Rafael María Canton Moreno, 1994**

---

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología

Tesis Doctoral

**β-LACTAMASAS PLASMIDICAS  
DE ESPECTRO AMPLIADO EN  
*Enterobacteriaceae***

Rafael M<sup>a</sup> Cantón Moreno

Madrid, 1994

---



HOSPITAL RAMON Y CAJAL  
AREA SANITARIA 4  
28034 MADRID



**D. Fernando Baquero Mochales**, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y **D. Jesús Martínez Beltrán**, Jefe de Sección del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid,

**CERTIFICAN:** Que el presente trabajo titulado " **$\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado en *Enterobacteriaceae***" realizado por **D. Rafael M<sup>a</sup> Cantón Moreno**, Licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, se ha desarrollado bajo nuestra dirección para optar al título de Doctor en Farmacia.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a quince de Enero de mil novecientos noventa y cuatro.

D. Fernando Baquero Mochales  
Dr. en Medicina y Cirugía

D. Jesús Martínez Beltrán  
Dr. en Farmacia

---

*A M<sup>a</sup> Paz y Rafael, . . .*

*A mis padres.*

---



---

### ***Agradecimientos.***

Siempre resulta difícil acordarse de todas las personas que a lo largo de un trabajo tan dilatado han colaborado y participado para que éste llegue a su fin. A todas ellas mi más sincero agradecimiento.

Agradezco al Dr. Fernando Baquero, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, su confianza en mí; como maestro de la Microbiología y del mundo de los antimicrobianos, su entusiasmo y brillantez de ideas han influido decisivamente en mi formación como microbiólogo. El trabajo durante estos años ha hecho crecer la admiración por mi parte y, creo, la amistad mutua. Como Director de esta Tesis, su estímulo y orientación han resultado imprescindibles.

Agradezco al Dr. Jesús Martínez-Beltrán, Jefe de la Sección de Antibióticos del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, su amistad y apoyo desde mi entrada en el Laboratorio de Antibióticos, primero como residente y luego como compañero; compartir la tarea diaria del laboratorio siempre resulta enriquecedor y excitante. Como Director de esta Tesis, su rigor y conocimientos quedan plasmados en el presente trabajo.

Agradezco al Profesor César Nombela, Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, su aceptación como ponente de esta Tesis. Su orientación y consejos a lo largo de mi carrera profesional fueron siempre acertados.

Agradezco a los Dres. Elena Loza y Luís de Rafael su amistad, colaboración y valiosos consejos, al Dr. Manuel Martínez-Ferrer su generosidad desde el comienzo del presente trabajo, y al resto de mis compañeros por su paciente espera y estímulo permanente.

Agradezco al Dr. José Claudio Pérez-Díaz su ayuda y disposición, que permitió me "iniciara" en el mundo de la Genética, al Dr. Jesús Blazquez su valiosa colaboración científica y técnica y al resto de los componentes del Laboratorio de Genética por su continua disposición.

Agradezco al Dr. Antone Medeiros del Miriam Hospital, Brown University en Rhode Island haberme facilitado su colección de cepas con  $\beta$ -lactamasas patrones y su interés en la discusión de los resultados del presente trabajo.

Agradezco a las Dras. Marisa Morosini y Cristina Negri su compañía y ayuda a lo largo de tantas horas de trabajo compartidas en el laboratorio.

---

Agradezco a mis compañeros de residencia Alberto León, Matilde Elfa, Juan Antonio Reguera, Elena Ródenas y al resto de residentes y becarios su amistad y estímulo.

Agradezco a Felisa Almaraz, Francisco Soriano, Isabel Soler, Amparo Gallego, Montserrat Gallego y demás personal técnico de nuestro servicio su colaboración y ayuda técnica imprescindible en la consecución del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Daniel Boixeda, Adjunto del Servicio de Gastroenterología y Coordinador de Docencia del Hospital Ramón y Cajal, su amistad, confianza y ayuda que han resultado decisivas en mi carrera profesional.

Agradezco a Domingo Sánchez su paciente y minuciosa revisión de los datos numéricos.

Agradezco al Dr. Francisco Zaragoza, Catedrático de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá de Henares, su amistad, honestidad y dedicación en mi etapa como becario en la Universidad donde comenzó mi interés por la investigación.

Agradezco al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social por el interés demostrado en este proyecto mediante la concesión de una Beca de Ampliación de Estudios en el año 1991.

Agradezco, finalmente, a todas aquellas personas que durante mis años de formación en la Universidad y posteriormente en el mundo hospitalario han contribuido a mi formación personal y científica.

A mis padres por el cariño y la educación recibida, y en especial a M<sup>a</sup> Paz, mi esposa, por su profunda generosidad en el tiempo robado durante tantas horas de trabajo, mi más sincero agradecimiento.

## **INDICE**

---

<b>I.- <u>INTRODUCCION.</u></b>	1
1.- <b><math>\beta</math>-LACTAMASAS: PERSPECTIVA HISTORICA Y CLASIFICACION GENERAL.</b>	2
2.- <b><math>\beta</math>-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.</b>	9
2.1.- Aproximación conceptual.	9
2.2.- Características bioquímicas y genéticas.	9
2.3.- Clasificación de las $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado.	12
2.3.1.- De clase A: oxiimino- $\beta$ -lactamasas y oxiimino-cefalosporinasas.	16
2.3.2.- De clase B: carbapenemasas.	18
2.3.3.- De clase C: cefamicinasas.	18
2.3.4.- De clase D: oxacilinasas de espectro ampliado.	20
2.3.5.- $\beta$ -lactamasas plasmídicas de tipo TEM con resistencia a inhibidores de $\beta$ -lactamasas.	21
3.- <b>BASES GENETICAS Y MOLECULARES DE LAS <math>\beta</math>-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.</b>	22
3.1.- Alteraciones de la secuencia-base.	22
3.2.- Configuración estructural de la proteína.	27
3.3.- Localización de los genes.	28
3.4.- Genes de resistencia asociados.	31
4.- <b>EXPRESION DE LAS <math>\beta</math>-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.</b>	32
4.1.- Aspectos genéticos.	32
4.2.- Aspectos bioquímicos.	33
4.3.- Fenotipos de resistencia.	35
4.4.- Influencia de la permeabilidad.	39
5.- <b>IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS <math>\beta</math>-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.</b>	41
6.- <b>EPIDEMIOLOGIA DE LAS <math>\beta</math>-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.</b>	45
6.1.- Distribución y prevalencia.	46
6.2.- Repercusión clínica.	48
<b>II.- <u>OBJETIVOS.</u></b>	51

<b>III.- MATERIAL Y METODOS.</b>	52
1.- MICROORGANISMOS.	52
1.1.- Aislamientos clínicos.	52
1.2.- Cepas con $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado.	52
1.2.1.- Procedentes de muestras clínicas.	52
1.2.2.- Procedentes de portadores fecales.	53
1.3.- Cepas de referencia.	53
2.- ANTIMICROBIANOS.	54
3.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.	55
3.1.- Método de difusión con disco.	55
3.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	55
3.2.1.- Método de dilución en agar.	55
3.2.2.- Método de microdilución.	56
3.2.3.- Método del "Epsilon-Test".	56
3.3.- Estudio con inhibidores de $\beta$ -lactamasas.	57
3.3.1.- Prueba de doble difusión con discos.	57
3.3.2.- Sinergia con inhibidores de $\beta$ -lactamasas.	57
3.4.- Puntos críticos de resistencia.	57
4.- CARACTERIZACION DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.	58
4.1.- Obtención del extracto crudo enzimático.	58
4.2.- Determinación del punto isoelectrico.	59
4.3.- Determinación de la actividad enzimática específica.	59
4.3.1.- Determinación del contenido de proteínas.	59
4.3.2.- Actividad $\beta$ -lactamasa.	59
4.4.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín.	60
4.5.- Hibridación en colonia con sondas de ADN.	61
4.5.1.- Preparación y lisis de las colonias.	61
4.5.2.- Preparación y marcado de las sondas.	61
4.5.3.- Hibridación y autorradiografía.	62
5.- ESTUDIOS GENETICOS.	62
5.1.- Extracción del ADN plasmídico.	62
5.1.1.- Lisis clara.	62
5.1.2.- Lisis alcalina.	63
5.1.3.- Purificación del ADN plasmídico.	63
5.1.4.- Electroforesis en geles de agarosa.	64
5.1.5.- Medida del tamaño molecular de los plásmidos.	64

### III.- MATERIAL Y METODOS (continuación).

5.2.- Transferencia de la resistencia. ....	64
5.2.1.- Conjugación y frecuencia de conjugación. ....	64
5.2.2.- Transformación. ....	65
5.2.3.- Transformación por electroporación. ....	66
5.3.- Extracción del ADN cromosómico. ....	66
 6.- RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS NO $\beta$ -LACTAMICOS EN <i>Enterobacteriaceae</i> CON $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO. ....	 67
6.1.- Resistencia a aminoglicósidos: enzimas modificantes.....	67
6.1.1.- Actividad acetiltransferasa. ....	68
6.1.2.- Actividad nucleotidiltransferasa. ....	68
6.1.3.- Actividad fosfotransferasa. ....	69
6.2.- Resistencia a quinolonas: mutaciones en <i>gyrA</i> . ....	69
6.3.- Resistencia a tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y fosfomicina. ....	69
 7.- ANALISIS EPIDEMIOLOGICO. ....	70
7.1.- Datos microbiológicos. ....	70
7.2.- Pacientes y factores epidemiológicos asociados.....	70
 8.- METODOS ESTADISTICOS. ....	70
 IV.- <u>RESULTADOS</u> . ....	71
1.- INCIDENCIA Y EVOLUCION DE LA SENSIBILIDAD-RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS EN <i>Enterobacteriaceae</i> (1987-1992). ....	71
1.1.- <i>Escherichia coli</i> . ....	72
1.2.- <i>Salmonella spp.</i> . ....	73
1.3.- <i>Proteus mirabilis</i> . ....	73
1.4.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> . ....	74
1.5.- <i>Proteus vulgaris</i> . ....	75
1.6.- <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Enterobacter aerogenes</i> . ....	75
1.7.- <i>Citrobacter freundii</i> . ....	75
1.8.- <i>Morganella morganii</i> . ....	77
1.9.- <i>Serratia marcescens</i> . ....	77
 2.- ANALISIS DE LOS FENOTIPOS DE SENSIBILIDAD-RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS EN <i>Enterobacteriaceae</i> (1987-1992). ....	101
2.1.- <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> y <i>Proteus mirabilis</i> . ....	101
2.2.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> . ....	103

#### IV.- RESULTADOS (continuación).

2.3.- <i>Proteus vulgaris</i> . ....	103
2.4.- <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , y <i>Serratia marcescens</i> . ....	104
<b>3.- DEFINICION DE FENOTIPOS CONFERIDOS POR PROTOTIPOS DE B-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.</b> ....	106
3.1.- Diferenciación de grupos fenotípicos. ....	108
3.2.- Estudio comparativo de las técnicas de difusión por disco, dilución y "Epsilon-Test". ....	110
3.3.- Influencia de mutaciones en las proteínas de membrana externa ( <i>ompF</i> ). ....	112
<b>4.- ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE LAS B-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO (B1PEA) EN <i>Enterobacteriaceae</i> (1987-1992).</b> ....	115
4.1.- Identificación inicial. ....	115
4.2.- Caracterización por isoelectroenfoque. ....	117
4.3.- Grupo 1.- B1PEA de pI 7,6: Fenotipos SHV-2 y SHV-6. ....	120
4.3.1.- Perfil de sensibilidad y sinergia. ....	120
4.3.2.- Actividad enzimática específica. ....	128
4.3.3.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín. ....	129
4.3.4.- Transferencia de la resistencia y frecuencia de conjugación. ....	129
4.3.5.- Análisis plasmídico e hibridación en colonia. ....	132
4.4.- Grupo 2.- B1PEA de pI 5,9: Fenotipos TEM-6/8 y TEM-4. ....	134
4.4.1.- Perfil de sensibilidad y sinergia. ....	134
4.4.2.- Actividad enzimática específica. ....	136
4.4.3.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín. ....	137
4.4.4.- Transferencia de la resistencia y frecuencia de conjugación. ....	142
4.4.5.- Análisis plasmídico e hibridación en colonia. ....	142
4.5.- Grupo 3.- B1PEA de pI 5,4. ....	143
4.5.1.- Perfil de sensibilidad y sinergia. ....	143
4.5.2.- Actividad enzimática específica. ....	145
4.5.3.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín. ....	145
4.5.4.- Transferencia de la resistencia y frecuencia de conjugación. ....	147
4.5.5.- Análisis plasmídico e hibridación en colonia. ....	147

#### IV.- RESULTADOS (continuación).

5.- RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS NO $\beta$ -LACTAMICOS EN <i>Enterobacteriaceae</i> CON $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO. ....	150
5.1.- Enzimas modificantes de aminoglicósidos y co-transferencia de la resistencia. ....	151
5.2.- Resistencia a quinolonas por mutaciones en <i>gyrA</i> . ....	154
5.3.- Resistencia a tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y fosfomicina. ....	154
6.- EPIDEMIOLOGIA DE LAS $\beta$ lPEA. ....	155
6.1.- Grupo 1.- $\beta$ lPEA de pI 7,6: SHV-2 y SHV-6. ....	158
6.2.- Grupo 2.- $\beta$ lPEA de pI 5,9: TEM-6/8 y TEM-4. ....	159
6.3.- Grupo 3.- $\beta$ lPEA de pI 5,4. ....	161
6.4.- Portadores fecales de <i>Enterobacteriaceae</i> productoras de $\beta$ lPEA. ....	161

#### V.- DISCUSION. ....164

1.- EVOLUCION DE LA SENSIBILIDAD Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS EN <i>Enterobacteriaceae</i> (1987-1992). ....	164
1.1.- <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>Proteus mirabilis</i> . ....	164
1.2.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> . ....	173
1.3.- <i>Proteus vulgaris</i> . ....	176
1.4.- <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Citrobacter</i> <i>freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , y <i>Serratia marcescens</i> . ....	179
2.- IDENTIFICACION Y AGRUPAMIENTO FENOTIPICO DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO. ....	184
3.- $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO EN <i>Enterobacteriaceae</i> EN EL HOSPITAL RAMON Y CAJAL (1987-1992). ....	188

#### VI.- CONCLUSIONES. ....202

#### VII.- BIBLIOGRAFIA. ....205



## **I.- INTRODUCCION**

---

Transcurridos 65 años desde que Fleming (173) observara la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* por colonias de *Penicillium notatum* y propiciara el descubrimiento de la penicilina, son ya más de 50 las penicilinas, 70 las cefalosporinas, 3 los monobactams y 3 los carbapenems desarrollados por la industria farmacéutica y utilizados terapéuticamente. Este ingente número de compuestos ha estado determinado por la gran capacidad de adaptación de los microorganismos que, progresivamente, han hecho ineficaces los sucesivos antibióticos introducidos en la práctica clínica. Sin embargo, la aparente versatilidad de las bacterias se limita a la adquisición de un número reducido de mecanismos de resistencia: modificaciones en los procesos de entrada del antibiótico, producción de enzimas que comprometen la viabilidad del antibiótico y alteraciones de los lugares diana o de actuación del antibiótico.

La inactivación enzimática, y en concreto las  $\beta$ -lactamasas, constituyen el mayor éxito estratégico de los microorganismos en su esfuerzo por contrarrestar el efecto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos desarrollados por el hombre. La diseminación de los genes productores, frecuentemente asociados a transposones y plásmidos transmisibles, entre distintos microorganismos ha dado lugar a una alta prevalencia de la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos clásicos. Una nueva generación de enzimas -  **$\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado** - derivadas de otras ya conocidas y con mayor espectro hidrolítico que sus predecesoras, ha determinado que, en la actualidad, no exista un solo antibiótico  $\beta$ -lactámico que escape a su acción hidrolítica. Estas enzimas son fruto de un proceso adaptativo que incluye mutaciones, recombinaciones e integraciones de elementos cromosómicos en plásmidos, constituyendo el amplio uso de los antimicrobianos la principal condición de selección. Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado se han descrito en *Enterobacteriaceae* y excepcionalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, pero es sólo cuestión de tiempo su síntesis por microorganismos hasta la fecha carentes de ellas.

## 1.- $\beta$ -LACTAMASAS: PERSPECTIVA HISTORICA Y CLASIFICACION GENERAL.

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactama de penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana (213,559). Estas enzimas constituyen, en la actualidad, el principal determinante de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de la mayoría de las bacterias patógenas (362,508).

**Fleming** (173) en 1929, un año después del descubrimiento de la penicilina, observó que bacterias del grupo "coli-tifoidea" no eran inhibidas por la penicilina. Años más tarde, en 1940, **Abraham y Chain** (1) confirmaron por vez primera la existencia de estas enzimas al demostrar que extractos de cultivos de *Escherichia coli* eran capaces de inactivar la penicilina, recibiendo por este motivo, el nombre genérico de "penicilinasas". Posteriormente, en 1944, **Kirby** (277) constató que su síntesis no era exclusiva de microorganismos gramnegativos, ya que aislamientos de *Staphylococcus aureus* que presentaban resistencia a la penicilina, producían también estas enzimas. La selección y diseminación fue rápida; en 1948 un 50% de las cepas de *S. aureus* producían penicilinasas (56) y años más tarde esta cifra era cercana al 80% (462). Una posible explicación de este hecho fue planteada en 1963 por **Novick** (419) al demostrar que el gen que codifica la producción de penicilinasas en *S. aureus* era de naturaleza plasmídica. Asimismo, **Datta y Kontomichalou** (139) comunicaron en 1965 que la síntesis de penicilinasas (TEM-1) en *Enterobacteriaceae* era codificada por genes de resistencia contenidos en plásmidos.

Ese mismo año, el **Comité de Nomenclatura de Enzimas** definió las penicilinasas como penicilil amido  $\beta$ -lactam hidrolasas - EC 3.5.2.6. - (559). A partir de 1972 se incluyeron las cefalosporinasas, enzimas que presentan una mayor afinidad por sustratos derivados del ácido 7-aminocefalosporánico (502), dentro del apartado EC 3.4.2.8. La confusión generada por la diversidad de enzimas encontradas y las diferentes denominaciones que recibieron condujo en 1979 a la unificación de criterios, clasificándose todas las enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactama dentro del grupo EC 3.5.2.6. (213).

En los años 70 se describen un gran número de nuevas  $\beta$ -lactamasas, tanto plasmídicas como cromosómicas, e incluso se especula sobre la posibilidad, adelantada por **Smith y Hamilton-Miller** en 1963 (213) de que, al menos en gramnegativos, la producción de  $\beta$ -lactamasa cromosómica fuese específica de cada género o especie. En la década de los 80 **Saino y cols.** (497,498), **Amicosante y cols.** (10,11), **Matthew y Harris** (357) y **Marre y Aleksic** (351), estudiando las  $\beta$ -lactamasas en función de sus características bioquímicas y moleculares y no por su origen bacteriano, demostraron

que un mismo microorganismo podía producir diferentes tipos (10,11,497,498) o variedades de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas (357,351).

Los primeros intentos de clasificación de las numerosas  $\beta$ -lactamasas identificadas fueron abordados por Ayliffe en 1963 (24), Sawai y cols. en 1968 (518) y Jack y Richmond en 1970 (247), utilizando como único criterio diferenciador la capacidad hidrolítica sobre distintos sustratos. Unos años más tarde, en 1973, Richmond y Sykes (485) establecieron la que sería una de las primeras y más aceptadas clasificaciones de las  $\beta$ -lactamasas, cuya nomenclatura sigue siendo aún utilizada en la mayoría de los trabajos de investigación. Sus diferentes clases, cinco, se establecieron en función del origen, plasmídico o cromosómico; producción, constitutiva o inducible; perfil de sustrato y acción de algunos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

La primera clase, clase I, engloba enzimas cromosómicas activas principalmente sobre cefalosporinas que demuestran una inhibición competitiva por cloxacilina y carbenicilina pero no por el ácido clavulánico. Poseen un peso molecular entre 24.000 y 48.000 daltons, pudiendo distinguirse cuatro subclases, Ia, Ib, Ic, y Id, de expresión inducible, excepto las de tipo Ib. Las subclases Ia y Id incluyen enzimas de los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Citrobacter* y *Pseudomonas*. Poseen una gran repercusión clínica (306,502,504) ya que en sus estados "inducido" y "desreprimido" confieren resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y monobactams (306,307). De menor entidad clínica son las enzimas de la subclase Ic, que agrupa a un número reducido de  $\beta$ -lactamasas, oximinocefalosporinasas inducibles, cuyo representante más genuino es la  $\beta$ -lactamasa de *Proteus vulgaris* (231,503,518) también denominada cefuroximasas. Enzimas similares se han descrito en *Proteus penneri* (198), *Pseudomonas cepacia* (230,231), *Pseudomonas pseudomallei* (312) y *Xanthomonas maltophilia* (497,498). Estas  $\beta$ -lactamasas constituyen la excepción de la clase I, ya que son inhibidas por el ácido clavulánico, por lo que algunos autores definieron una nueva clase (Clase VI) (36,403). Esta última incluye también algunas de las enzimas encontradas con posterioridad en *Bacteroides spp.* (76,427,562,620). Por otra parte, la subclase Ib define las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *E. coli* y *Shigella*, cuya expresión, generalmente de bajo nivel (261), puede modificarse, sintetizándose de forma constitutiva cantidades elevadas de enzima (58,151,261,417,426).

La clase II agrupa enzimas cromosómicas, predominantemente activas sobre penicilinas que se inhiben de forma competitiva por la cloxacilina pero no por la carbenicilina. Son de un tamaño inferior a las anteriores, 25.000-30.000 daltons y se diferencian por su movilidad electroforética. Su relevancia clínica es nula, circunscribiéndose, casi exclusivamente, a  $\beta$ -lactamasas raramente encontradas en *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* y *Vibrio parahaemolyticus* (36,403).

Dentro de la clase III se incluyeron las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro TEM-1 y TEM-2, que poseen actividad penicilinasas y cefalosporinasas, son sensibles a la inhibición por la cloxacilina, ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y resistentes a la inhibición por carbenicilina y p-cloromercurobenzoato (pCMB) (213,248,314). Esta definición permitió con posterioridad la inclusión en este grupo, entre otras, de las  $\beta$ -lactamasas SHV-1, HMS-1 (359), OHIO-1, ROB-1 (366), LXA-1 (615) y TLE-1 (365), que poseen características bioquímicas similares y un peso molecular aproximado de 17.000 a 29.000 daltons. Estas  $\beta$ -lactamasas, de marcada trascendencia clínica, han sido descritas y encontradas en numerosos géneros y especies: *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas* (13,254,304,356, 363,366,492,603,607).

La clase IV engloba  $\beta$ -lactamasas cromosómicas constitutivas de amplio espectro con un perfil muy parecido al anterior pero sensibles al pCMB y resistentes a la inhibición por cloxacilina. Su peso molecular oscila entre 18.000 y 25.000 daltons, diferenciándose entre sí por la movilidad electroforética. En este grupo se encuentran algunas de las  $\beta$ -lactamasas de *Moraxella catarrhalis* y *Bacteroides fragilis*, si bien las más estudiadas son las  $\beta$ -lactamasas de *Klebsiella* (36,403). Estas, al igual que las de clase Ic, son inhibidas eficazmente por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas - ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam - y poseen un amplio rango de pI, entre 5,3 y 9,2 (358,478,503). En *Klebsiella pneumoniae* es mayoritaria la población con  $\beta$ -lactamasas de pI de 7,1 correspondiente a la  $\beta$ -lactamasa LEN-1 (14). En *Klebsiella oxytoca* se agrupan en torno a los pI 7,8, 5,3 y 6,5, coincidente este último con la  $\beta$ -lactamasa denominada K1 que muestra un perfil hidrolítico que afecta también a oximinocefalosporinas y al aztreonam, excluyendo las cefamicinas, la ceftazidima y el moxalactam (90,93,155,265,337).

La clase V está integrada por enzimas plasmídicas de amplio espectro con actividad principalmente penicilinasas, con resistencia al pCMB e inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Esta clase de enzimas, que poseen un peso molecular entre 24.000 y 46.000 daltons, se subdivide a su vez en cuatro subclases. Las dos primeras, Va y Vb, hidrolizan la cloxacilina y se encuentran generalmente en *Enterobacteriaceae*; OXA-1,2,3...9 (13,178,356,366,492,603,607) y PSE-2 (OXA-10) (366,607), mientras que las otras dos, Vc y Vd son poco activas sobre cloxacilina y tampoco se inhiben por este compuesto, sintetizándose en su mayoría por el género *Pseudomonas*: PSE-1,3 y 4 y CARB-3 y 4 (184,305,356,363,366,454,607).

Por ser la clasificación de **Richmond y Sykes** un esquema diseñado para las  $\beta$ -lactamasas de microorganismos gramnegativos, no incluye las de grampositivos. Estas quedan prácticamente representadas, por su mayor prevalencia (607), por las  $\beta$ -lactamasas de *Staphylococcus*, si bien se

han descrito en otros grampositivos: *Bacillus* (90,91), *Clostridium* (219), *Nocardia* (593) y *Enterococcus* (317,388,389). Atendiendo a criterios cinéticos, serológicos y de perfil de sustrato, en *Staphylococcus* se han clasificado cuatro tipos de  $\beta$ -lactamasas (A,B,C y D) codificadas por plásmidos (321,484). Su acción hidrolítica afecta a todas las penicilinas naturales y semisintéticas y con mucha menor eficacia a la meticilina, oxacilina y cefalosporinas, siendo inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Todas ellas son extracelulares y, excepto las del tipo D, inducibles por antibióticos  $\beta$ -lactámicos (150,321,362).

El esquema de **Richmond y Sykes** no fue único y surgieron en años sucesivos otros muchos que, con mayor o menor suerte, recurrían a criterios inmunológicos, moleculares (peso molecular, punto isoeléctrico, secuencia de aminoácidos, características del centro activo) y cinéticos (perfil de sustrato,  $V_{\max}$ ,  $K_m$ , eficiencia hidrolítica), carácter inducible o constitutivo, localización intra o extracelular o localización del gen productora (8,59,240,260,356,362,363,366,378,429,460,503). Entre los esquemas que confieren mayor importancia a la naturaleza proteica de las  $\beta$ -lactamasas que a la expresión genética o las características cinéticas, destaca la clasificación de **Ambler** (8) de 1980, que fue completada posteriormente por **Jaurin y Gundstrom** en 1981 (260) y **Bergstrom y cols.** (59) en 1982. Esta nueva propuesta es el resultado de la aplicación de las técnicas de secuenciación de aminoácidos y nucleótidos y establece 3 clases distintas.

La clase A está formada por aquellas  $\beta$ -lactamasas penicilinasas que poseen un resto de serina en su centro activo y tienen un peso molecular aproximado de 28.000-30.000 daltons. A este grupo pertenecen las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Bacillus*, *Streptomyces* y *Klebsiella* y las plasmídicas de tipo TEM y SHV de gramnegativos, así como la enzima PC1 de *S. aureus*, incorporándose muy recientemente algunas  $\beta$ -lactamasas caracterizadas en *Bacteroides* (436). A pesar de presentar una relativa homología entre ellas, sus pI se sitúan en un amplio rango de pH (5,4- >9,5). Asimismo, su espectro hidrolítico se ha visto últimamente ampliado por la incorporación de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas que confieren resistencia a la cefoxitina o al imipenem y menor sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación, manteniendo sensibilidad a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Entre éstas la enzima NOR-1 (pI 6,9) caracterizada en *Enterobacter cloacae* (390,414) presenta similares características a las carbapenemasas descritas en *Serratia marcescens* (619).

La clase B está constituida por metaloenzimas dependientes de  $Zn^{2+}$ . Poseen un peso molecular variable (22.000-120.000), son inactivadas por agentes quelantes como el EDTA, no se inhiben por el ácido clavulánico y poseen, en general, actividad carbapenemasa (91,310). Al igual que la clase anterior incluye tanto  $\beta$ -lactamasas cromosómicas - *Bacillus cereus* (2), *Aeromonas* (352),

*X. maltophilia* (498), *Flavobacterium odoratum* (515), *Legionella gormanii* (176), *B. fragilis* (118) - como plasmídicas - *P. aeruginosa* (595), *B. fragilis* (25) -.

Por último, la clase C, cuyo prototipo es la  $\beta$ -lactamasa AmpC de *E. coli*, la conforman cefalosporinasas con un peso molecular elevado (aproximadamente de 39.000 daltons). Poseen un resto de serina en su centro activo pero no tienen homología secuencial con las  $\beta$ -lactamasas de clase A (260). A este grupo pertenecen las enzimas cromosómicas de *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella* y *Pseudomonas*. En esta clase deberían incluirse las enzimas plasmídicas CEP-1 (69) y CEP-2 (292) que muestran homología con AmpC de *E. coli* e hidrolizan cefalosporinas preferentemente. La primera posee un pI de 8,7 y no es inhibida por el ácido clavulánico, mientras que la segunda, con un pI de 8,1, es sensible a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Asimismo, dentro de este grupo han de clasificarse las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase I, recientemente descritas, - CMY-1 y -2 (40,45), MIR-1 (435), BIL-1 (445), MOX-1 (236), LAT-1 (577) y FOX-1 (192).

Los trabajos de Oullete y cols. en 1987 (429) y Huovinen y cols. en 1988 (240) completaron esta clasificación al definir un nuevo tipo de enzimas, clase D, que acoge las  $\beta$ -lactamasas OXA-1, OXA-2 y PSE-2 (OXA-10) con posibilidad de ampliarse al resto de las oxacilinasas. Estas  $\beta$ -lactamasas muestran una gran homología entre sí pero no con las enzimas de tipo TEM (Clase A) o AmpC (Clase C)(240) .

El esquema de clasificación molecular de Ambler, que además establece relaciones filogenéticas, parece ser el modelo a desarrollar. Los continuos avances en la biología molecular permitirán una mayor definición de sus grupos, la adscripción a ellos de  $\beta$ -lactamasas ya conocidas y la estructuración de nuevas clases. En su defecto y por el momento se han de utilizar características bioquímicas que aseguren una adecuada diferenciación y simultáneamente un agrupamiento de  $\beta$ -lactamasas afines. En esta línea de pensamiento, Bush en 1988 (87) estableció las bases de una novedosa y ambiciosa clasificación, en apariencia más compleja, que publica definitivamente en 1989 (90,91).

En esta nueva clasificación, por el momento el último esquema propuesto, se recurre al perfil de sustrato y a la inhibición por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico) para agrupar las enzimas de tal forma que puedan incluirse en la misma categoría aquellas  $\beta$ -lactamasas relacionadas entre sí. En este sentido, se establecen cuatro grandes grupos todos ellos homogéneos constituidos por un solo subgrupo, a excepción del grupo 2 que se divide en 6 subgrupos atendiendo fundamentalmente al patrón hidrolítico (TABLA 1).

TABLA 1.- Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas (modificada de K. Bush - 1989 -)

Grupo Subtítulo	Substrato	Inhibición CLV EDTA	pI	Enzimas representativas	Bacteria	Localización	Clase <sup>a</sup> molecular
1 CEP-N	CEP	- -	5,2-9,6	Ia,Ib,Id(R/S) <sup>b</sup> CEP-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i>	Cr Pl Cr	C
2a PEN-Y	PEN	+ -	5,0-8,0	PC1 I,III	<i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Streptomyces</i>	Cr/Pl	A
2b BDS-Y	PEN CEP	+ -	5,3-9,3	TEM-1,2 SHV-1 OHIO-1 ROB-1... LEN-1 IV(R/S)	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Haemophilus</i> <i>Klebsiella</i>	Pl Cr	A
2b' EBS-Y	PEN CEP(CTX) ATM	+ -	5,2-8,9	TEM-3...26 SHV-2...6 K1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>K. oxytoca</i>	Pl	A
2c CAR-Y	PEN CARB	+ -	4,3-7,1	PSE-1,3,4 CARB-3,4 BRO-1,2,3	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>M. catarrhalis</i>	Pl Cr	A
2d CLX-Y	PEN CLOX	+ -	6,1-8,7	PSE-2 OXA-1...9	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	Pl	D
2e CEP-Y	CEP	+ -	4,7-9,2	Ic(R/S) L2	<i>P. vulgaris</i> <i>X. maltophilia</i>	Cr	A
3 MET-N	Variable (IMP)	- +	6,1-10,5	Metaloenzimas II, LI	<i>B. cereus</i> <i>X. maltophilia</i>	Cr	B
4 PEN-N	PEN	- +/-	4,4-6,5	LCR-1	<i>Bacteroides</i> <i>P. cepacia</i> <i>P. aeruginosa</i>	Cr Pl	?

PEN: penicilinas; CEP: cefalosporinas; CTX: cefotaxima; ATM: monobactams;

CARB: carbenicilina; CLOX: cloxacilina; IMP: carbapenems; CLV: ácido clavulánico.

<sup>a</sup>: Clases moleculares de la clasificación de Ambler (1980), Jaurin y Gundstrom (1980), Bergstrom y cols. (1982), Oullete y cols. (1987) y Huovinen y cols. (1988).

<sup>b</sup>: Clases enzimáticas de la clasificación de Richmond y Sykes (1973).

El grupo 1 - CEP-N - está formado por  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de gramnegativos que hidrolizan preferentemente las cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico. Este grupo se correlaciona con las clases Ia, Ib y Id de Richmond y Sykes que confieren, con la excepción del grupo Ib, en su estado inducido o desreprimido resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación.

El grupo 2, sin duda el más heterogéneo, se subdivide en 6 subgrupos y está constituido por  $\beta$ -lactamasas que se inhiben por el ácido clavulánico. El subgrupo 2a - PEN-Y - recoge las



penicilinasas clásicas de grampositivos donde se incluyen las enzimas de *S. aureus*, *Bacillus* y *Streptomyces* y las descritas recientemente en *Enterococcus* (317,388,389). El subgrupo 2b, - BDS-Y - lo integran las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro de gramnegativos, representadas por TEM-1, TEM-2 y SHV-1 y las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Klebsiella*. En el subgrupo 2b' - EBS-Y - se amplía el espectro hidrolítico del grupo anterior, afectando no sólo a penicilinas y cefalosporinas clásicas sino también a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, siendo igualmente inhibidas por el ácido clavulánico. Este grupo, creado para las  **$\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado (BIPEA)** objeto de este trabajo, incluye también algunas enzimas cromosómicas con similares características, K1 de *K. oxytoca* (93,90,155,265,337) y PER-1 de *P. aeruginosa* (415). El subgrupo 2c - CAR-Y - y subgrupo 2d - CLX-Y - agrupan, respectivamente, las carbenicilinasas (PSE-1,3,4, CARB-3,4,5, BRO-1,2,3, AER-1 y SAR-1) y las oxacilinasas (PSE-2, OXA-1,2,3....9) que inactivan, respectivamente, carbenicilina y cloxacilina, siendo las primeras inhibidas de forma más eficaz por el ácido clavulánico que las segundas. Por último, el subgrupo 2e - CEP-Y - reúne a las oximiinocefalosporinasas de codificación cromosómica. Clasificadas por **Richmond y Sykes** dentro del grupo Ic, su más genuino representante es la cefuroximasas de *P. vulgaris*. Esta enzima o grupo de enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico y en estado inducido o desreprimido pueden inactivar la cefotaxima y en menor medida la ceftazidima.

El grupo 3 - MET-N - incluye las  $\beta$ -lactamasas que precisan de un ión metálico para ejercer su actividad enzimática (metaloenzimas). Pertenecen a la clase B de la clasificación molecular de **Ambler** y, al igual que el siguiente y último grupo, generalmente no son inhibidas por el ácido clavulánico. El grupo 4 - PEN-N -, poco definido desde el punto de vista molecular, está constituido por un número reducido de penicilinasas de escasa repercusión clínica que han sido descritas en *Bacteroides*, *P. cepacia*, *Alcaligenes faecalis* y *Clostridium butyricum*. A excepción de la enzima plasmídica LCR-1 encontrada en *P. aeruginosa* (366), todas son de codificación cromosómica.

Esta clasificación de **Bush**, comúnmente utilizada en los trabajos de investigación, permite acoger nuevas  $\beta$ -lactamasas descritas con posterioridad a su publicación. Sirvan de ejemplo las **BIPEA** que, "recluidas" inicialmente dentro del grupo 2b', han "expandido" su localización. En la actualidad estas enzimas pueden también encuadrarse, como veremos posteriormente, dentro de los grupos 1 - CEP-N -(cefamicinasas) (40,45,192,236,435,445,577,611), 2d - CLX-Y - (oxacilinasas de espectro ampliado) (211,313), 2e - CEP-Y -(oximiinocefalosporinasas plasmídicas) (590,596) y 3 - MET-N - (carbapenemasas plasmídicas relacionadas con las metaloenzimas) (25,595). Si las primeras **BIPEA** (2b') se encontraban dentro de la clase molecular A de la clasificación de **Ambler**, cada una de estas nuevas posibilidades se enmarca dentro del resto de las clases establecidas: las carbapenemasas en la clase B, las cefamicinasas en la clase C y las oxacilinasas de espectro

ampliado, recientemente caracterizadas, en la clase molecular D (211). Una última posibilidad, esbozada como hipótesis por **Bush** (89) y no incluida en este esquema, es la síntesis de enzimas que, derivando de  $\beta$ -lactamasas del grupo 2b, demuestran resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (66,569,584). Esta situación obligaría a la estructuración de nuevos grupos o a una definición mas flexible de los grupos ya existentes.

## **2.- $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.**

### **2.1.- Aproximación conceptual.**

Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado - **BIPEA** - son un grupo de nuevas enzimas de codificación plasmídica derivadas de otras  $\beta$ -lactamasas bien conocidas y ampliamente diseminadas entre las bacterias patógenas que, además de afectar a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos clásicos, hidrolizan los " $\beta$ -lactámicos de 3ª generación" incorporados al arsenal terapéutico a partir de 1980 - cefotaxima, ceftazidima y aztreonam - (89,252,253,438). Recientemente esta definición se ha ampliado, incluyéndose aquellas enzimas de codificación plasmídica que hidrolizan metoxi- $\beta$ -lactámicos - cefoxitina - (252,441) y carbapenems - imipenem y meropenem - (252,310) y aquellas que demuestran resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas - ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam - (66,569,584). Estas enzimas constituyen, una vez más, la demostración del proceso adaptativo de las bacterias para contrarrestar el efecto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos sintetizados por el hombre y sucesivamente introducidos en la práctica clínica.

### **2.2.- Características bioquímicas y genéticas.**

**Bush** y **Sykes** en 1986 (96) y posteriormente **Bush** en 1989 (88) marcaron el camino a seguir para la caracterización de las  $\beta$ -lactamasas. El amplio número de enzimas descritas determina que el estudio de nuevas  $\beta$ -lactamasas debe ser especialmente cuidadoso con el fin de obtener una adecuada individualización. Es necesaria la aplicación de diversas técnicas que nos proporcionen información de las características físicas del enzima y de los aspectos inmunológicos, cinéticos y genéticos característicos de cada  $\beta$ -lactamasa. Asimismo, es interesante conocer, entre otras propiedades, el carácter inducible o constitutivo de su síntesis o la codificación por plásmidos o por el cromosoma bacteriano

Entre las características físicas el **peso molecular** y, sobre todo, el punto isoeléctrico (pI) son las de mayor relevancia. El primero de ellos, poco utilizado en la actualidad, aunque útil cuando

hidrólisis ( $V_{\max}/K_m$ ). Su determinación es laboriosa por cuanto requiere el ensayo de diversas concentraciones de antibiótico. Aparte de estos valores, es frecuente la determinación del **perfil de inhibición**, o respuesta de las  $\beta$ -lactamasas a compuestos que inhiben su actividad hidrolítica. Los resultados se expresan utilizando la  $K_i$ , constante de equilibrio, o la  $I_{50}$ , concentración de inhibidor requerida para inhibir al 50% la actividad enzimática. Debido al incremento del número y clases de BIPEA descritas, además de los inhibidores suicidas, ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, es necesario el ensayo de otros inhibidores: quelantes de iones metálicos, modificadores de aminoácidos (pCMB), cloruro sódico, e incluso antibióticos de baja respuesta hidrolítica (cloxacilina, cefoxitina, moxalactam, aztreonam)(96).

El método basado en la **inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín**, específicamente diseñado por Papanicolaou y Medeiros (434) para el estudio de las BIPEA, parece de mayor utilidad. Esta técnica emplea extractos crudos sonicados sin purificar, exigiendo la presencia de una única  $\beta$ -lactamasa. Cada enzima presenta un perfil de inhibición característico para cada sustrato o inhibidor, que se utilizan a una concentración fija determinada. El perfil de inhibición, el porcentaje máximo de inhibición y el valor de la pendiente o incremento negativo de la inhibición, se correlaciona a juicio de los autores, con el pI y la secuencia de aminoácidos, reflejando alteraciones en la configuración del centro activo.

Aunque por el momento no existen BIPEA inducibles, el **ensayo de inducción** debe ser incluido ya que algunas de las BIPEA descritas derivan de cefalosporinas cromosómicas (40,45,236, 435,445,577) para las que el carácter de inducibilidad es un parámetro diferenciador. La inducción puede cuantificarse por espectrofotometría después de hacer crecer los microorganismos en presencia de sustratos  $\beta$ -lactámicos o por la técnica del doble disco (503,507).

La utilización de **antisueros** tuvo cierta relevancia en la identificación de  $\beta$ -lactamasas (484) y en la diferenciación de enzimas pertenecientes a la misma clase (363). Sin embargo, la obtención de  $\beta$ -lactamasas altamente purificadas y la separación de antisueros específicos limita su posible utilidad en el campo de las BIPEA.

Mención aparte merecen los **métodos genéticos** utilizados en la caracterización de las  $\beta$ -lactamasas, y en particular de las BIPEA, ya que junto a la determinación del pI, estudio cinético y perfil de sensibilidad, se han convertido en la piedra angular para la diferenciación de estas enzimas. En este sentido, las sondas de ADN, las técnicas de oligotipado y la secuenciación de nucleótidos y aminoácidos han supuesto un avance relevante tanto para la identificación de las BIPEA como para su caracterización.

La sondas de ADN marcadas con radioisótopos o acopladas a reacciones enzimáticas hibridan con el ADN extraído de las cepas objeto de estudio, permitiendo la localización cromosómica o plasmídica del gen productor de la  $\beta$ -lactamasa (268,567). Asimismo, la hibridación con colonias lisadas previamente (hibridación en colonia) detecta rápidamente la presencia de alguna enzima concreta (242). En 1990, Mabilat y Courvalin (322), utilizando sondas de tan solo 17 nucleótidos, describieron la técnica del oligotipado, que facilita la detección de mutaciones puntuales o cambios de un único aminoácido en la secuencia de la proteína. El empleo de este método en combinación con las modernas técnicas de ingeniería genética, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(142) y de la ligasa (LCR)(30), facilitarán en un futuro la caracterización y clasificación de las BIPEA.

### 2.3.- Clasificación de las $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado.

Inicialmente, las BIPEA recibieron denominaciones que hacían referencia a su origen (TEM, SHV), fenotipo de resistencia (CTX, CAZ, FUR) o al lugar, hospital o país donde fueron descubiertas (RHH, MGH, MIR), numerándose correlativamente por orden de aparición o descripción en el tiempo. Con posterioridad, se pudo comprobar que un mismo enzima había recibido denominaciones diferentes. Los primeros esquemas de clasificación de las BIPEA no se publicaron hasta 1991 (252,438), ocho años después de que Shah y Stille (523) y Knothe y cols. (280) describieran en Alemania un fenotipo nuevo y transferible en *Enterobacteriaceae* que confería resistencia a cefalosporinas de 3ª generación y monobactámicos. Estas primeras clasificaciones, publicadas por Payne y Amyes (438) y Jacoby y Medeiros (252) ya incluían, aunque en grupos pocos definidos, las BIPEA que confieren resistencia a cefamicinas y a carbapenems.

Payne y Amyes (438) basándose en los datos de hidrólisis ( $V_{max}$ ) o eficiencia relativa de hidrólisis ( $V_{max}/K_m$ ) de la cefotaxima y ceftazidima establecieron 4 grupos que recogían las BIPEA descritas hasta la fecha de su publicación. El grupo 1 comprende aquellas enzimas con baja eficiencia de hidrólisis para la ceftazidima y cefotaxima. En la mayoría de las ocasiones la hidrólisis de esta última es más eficiente, si bien, la menor capacidad de penetración en el espacio periplásmico de la ceftazidima (410), determina un valor de CMI superior al de la cefotaxima (251). Representantes de este grupo serían TEM-E1, E2 (CAZ-3), E4 y CAZ-Io (TEM-11). El grupo 2, que recoge las  $\beta$ -lactamasas TEM-E4, 6, 9, 10, CAZ-7 (TEM-16) y CAZ-hi, está formado por aquellas enzimas que poseen una mayor eficiencia hidrolítica para la ceftazidima que para la cefotaxima, obteniéndose unos valores de CMI para la ceftazidima de 32 a 128 veces más altos que para la cefotaxima (251,438). Por el contrario, el grupo 3 comprende aquellas  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan más eficientemente cefotaxima que ceftazidima, subdividiéndose, en función de su origen

genético en tres subgrupos. El subgrupo 3a deriva de TEM-1 y TEM-2; TEM-3, 4, 5, CAZ-2 (TEM-8) y CAZ-6 (TEM-24), el subgrupo 3b incluye las enzimas derivadas de SHV-1; SHV-2, 3, 4, y 5 y el subgrupo 3c - FEC-1 y DJP-1 - de origen desconocido, que en la actualidad se relacionan con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *K. oxytoca* (355,440).

Por último, **Payne y Amyes** (438), establecieron una cuarta clase, grupo 4, con un único representante, BIL-1, que define las  $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y, a diferencia de las anteriores, no son inhibidas por el ácido clavulánico. En este grupo, se albergarían las enzimas plasmídicas CMY-1,2 (40,45), MIR-1 (435), MOX-1 (236), LAT-1 (577) y FOX-1 (192) relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de la clase I de **Rychmond y Sykes** (485) que confieren resistencia a las cefamicinas y se denominan genéricamente "cefamicinasas".

La aplicación de técnicas genéticas de hibridación y el análisis de la secuencia nucleotídica permitió obtener, pese a sus limitaciones metodológicas, una valiosa información en el conocimiento de las distintas familias de enzimas y sus relaciones epidemiológicas (322). Aplicando estos criterios, **Jacoby y Medeiros** (252) revisan las BIPEA y establecen grupos según el origen de las mismas y su fenotipo de resistencia: derivadas de TEM, derivadas de SHV, aquellas que confieren resistencia a las cefamicinas y las metaloenzimas plasmídicas que confieren resistencia a los carbapenems. Partiendo de estos grupos y con el conocimiento actual podemos establecer una nueva clasificación, utilizando como criterios diferenciadores las clases moleculares de **Ambler** (8) y el fenotipo de resistencia (TABLA 2).

En este sentido, diferenciaríamos 4 grupos de BIPEA referidos a las 4 clases de  $\beta$ -lactamasas conocidas, - A, B, C y D -, cada una de ellas con un espectro hidrolítico particular (8,59,240,260,429). Las BIPEA de clase A hidrolizan oxiiimino- $\beta$ -lactámicos y constituyen el grupo más numeroso con más de 50 enzimas caracterizadas; las de clase B, metaloenzimas con actividad carbapenemasa; las de clase C o cefamicinasas, relacionadas con AmpC y las de clase D u oxacilinasas de espectro ampliado, recientemente identificadas (211).

TABLA 2.- Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado.

$\beta$ -lactamasa	Microorganismo	País de origen	Año	pI	CMI ( $\mu$ g/ml)			Referencia
					CAZ	ATM	CTX	
I.- BIPEA de CLASE A: Ia.- OXIMINO- $\beta$ -LACTAMASAS.- TEM-derivadas.								
TEM-3 (CTX-1)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1984a	6,3	64	16	32	80
TEM-4	<i>E. coli</i>	Francia	1986c	5,9	32	16	32	437
TEM-5 (CAZ-1)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1987a	5,55	128	8	4	450
TEM-6	<i>E. coli</i>	Alemania	1987c	5,9	128	64	1	42
TEM-7	<i>C. freundii</i>	Francia	1988c	5,41	64	2	0,5	206
(TEM-201) <sup>m</sup>	<i>E. coli</i>	---	1988c	5,41	32	1	0,06	206
TEM-8	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1989c	5,9	64	8	1	324
(CAZ-2)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1987a	6,0	64	8	4	533
TEM-9 (RHH-1)	<i>K. pneumoniae</i>	Inglaterra	1987c	5,5	128	128	2	552
TEM-10	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988c	5,57	64	32	1	472
(MGH-1)	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	5,5	512	64	2	253
(TEM-E3)	<i>E. cloacae</i>	Inglaterra	1989c	5,55	128	32	1	443
(BMH-1)	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1991c	5,6	R	--	--	578
TEM-11 (CAZ-10)	<i>K. pneumoniae</i>	Bélgica	1989c	5,7	4	0,2	0,06	590
TEM-12	<i>E. coli</i>	EEUU	1987c	5,25	4	0,2	0,06	599
(TEM-101) <sup>m</sup>	<i>E. coli</i>	---	1988c	5,3	4	0,2	0,06	206
(YOU-2)	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	5,2	64	8	0,5	481
TEM-13	<i>M. morganii</i>	b	1990a	5,6	--	--	--	322
TEM-14	<i>K. pneumoniae</i>	b	1990c	6,3	--	--	--	322
TEM-15	<i>K. pneumoniae</i>	b	1990c	6,0	--	--	--	322
TEM-16	<i>K. pneumoniae</i>	b	1990c	6,3	--	--	--	322
(CAZ-7)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1988a	6,3	256	64	4	131
TEM-17	<i>K. pneumoniae</i>	b	1990c	5,9	--	--	--	322
TEM-18	<i>K. pneumoniae</i>	b	1990c	6,3	--	--	--	322
TEM-19	<i>E. coli</i>	b	1990c	5,4	--	--	--	322
TEM-20	<i>K. pneumoniae</i>	Túnez	1986a	5,4	2	1	4	53
TEM-21	<i>K. pneumoniae</i>	Túnez	1988a	6,4	8	4	8	53
TEM-22	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1992c	6,3	32	256	8	18
TEM-23	<i>E. coli</i>	Francia	1992c	5,58	128	64	4	585
TEM-24 (CAZ-6)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1988a	6,5	512	128	8	129
TEM-26	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1989a	5,58	R	R	--	401
(YOU-1)	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	5,57	256	32	1	481
TEM-E1	<i>E. coli</i>	Bélgica	1987a	5,4	32	0,1	0,1	442
TEM-E2	<i>K. oxytoca</i>	Inglaterra	1982a	5,3	32	1	0,2	444
(CAZ-3)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1987a	5,3	16	1	0,1	533
TEM-E4	<i>S. marcescens</i>	Bélgica	1987a	5,6	16	1	1	438
CAZ-8	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1992c	5,6	R	--	--	287
CAZ-hi	<i>K. pneumoniae</i>	Bélgica	1989c	6,5	32	8	0,2	590
MRH-1	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1990c	5,4	R	8	8	470
CTX-2	<i>S. abdonaca</i>	Francia	1990a	5,3	4	1	8	467
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	5,2	>64	>64	≤0,5	541
sn	<i>E. cloacae</i>	Inglaterra	1986a	5,7-5,9	16	--	≤0,5	115
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	5,1	R	8	8	364
sn	<i>E. coli</i>	EEUU	1988a	5,2	R	8	8	364
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	5,35	R	8	8	364
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1987a	?	R	8	8	364
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1992c	5,95	R	--	--	573
sn	<i>K. pneumoniae</i>	Inglaterra	1988c	5,8	32	--	≤0,5	115
sn	<i>P. mirabilis</i>	Francia	1992c	>5,3	>1024	>128	>512	157
sn	<i>P. mirabilis</i>	Argentina	1991c	5,4	128	--	128	489
sn	<i>K. pneumoniae</i>	Argentina	1989c	6,0	--	--	--	105
sn	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1992c	6,4	--	--	--	330
sn	<i>P. mirabilis</i>	Francia	1992c	6,4	32	256	16	158

TABLA 2.- (Continuación).

β-lactamasa	Microorganismo	País de origen	Año	pI	CMI (µg/ml)					Referencia
					CAZ	ATM	CTX	FOX	IMP	
I.- <u>ALPEA de CLASE A: Ia.- OXIMINO-β-LACTAMASAS.- SHV-derivadas.</u>										
SHV-2	<i>K. ozaenae</i>	Alemania	1983a	7,6	32	32	64	2	0,1	279
SHV-3	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1986a	6,98	32	32	64	4	0,2	406
SHV-4(CAZ-5)	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1987a	7,75	128	256	64	4	0,2	85
SHV-5(CAZ-4)	<i>K. pneumoniae</i>	Chile	1987a	8,2	128	256	8	4	0,1	205
SHV-6	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	1991c	7,6	32	4	0,5	2	0,2	17
Ib.- <u>OXIMINOCEFALOSPORINASAS.-</u>										
FPM-1	<i>P. mirabilis</i>	Japón	1986a	7,2	0,39	--	25	--	--	596
FEC-1	<i>E. coli</i> <sup>d</sup>	Japón	1988c	8,2	25	200	200	6,2	0,1	355
KH	<i>K. pneumoniae</i>	Suecia	1987a	5,25	0,5	>16	1	--	<0,2	613
MEN-1	<i>E. coli</i>	Francia	1989a	8,4	32	--	28	4	0,5	60
Ic.- <u>No diferenciadas</u> (sin caracterizar definitivamente).-										
MJ-1	<i>K. oxytoca</i>	Francia	1988c	5,35	<0,5	--	--	--	--	143
MJ-2	<i>C. amalonaticus</i>	Francia	1988c	5,55	--	--	--	--	--	143
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	6,8-6,9	--	--	--	--	--	364
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	7,0-7,8	S	S	S	S	S	364
FUR	<i>K. pneumoniae</i>	Bélgica	1989a	7,5	16	16	2	4	0,2	590
sn	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	7,65	R	R	S	S	S	364
DJP-1	<i>K. pneumoniae</i>	India	1990c	7,9	--	--	--	--	--	440
CTX-M2	<i>S. typhimurium</i>	Argentina	1991c	7,9	32	4	4	--	--	39
CTX-M	<i>K. pneumoniae</i>	Alemania	1989a	8,9	4	64	128	4	--	41
Id.- Derivadas de TEM con resistencia a inhibidores de β-lactamasas.-										
TRI-1	<i>E. coli</i>	Francia	1989a	5,2	0,12	0,03	0,03	32/2 <sup>e</sup>	0,06	584
TRI-2	<i>E. coli</i>	Francia	1989a	5,2	0,12	0,03	0,03	64/2	0,03	584
TRC-1	<i>E. coli</i>	Escocia	1992c	5,25	0,25	--	0,03	32/16	--	569
IRT-3	<i>E. coli</i>	España	1992a	5,4	0,06	--	0,03	64/32	--	66
sn	<i>E. coli</i>	Francia	1992c	5,2-5,5	--	--	--	R	--	79,535
			1993c							225
II.- <u>ALPEA de CLASE B: CARBAPENEMASAS.-</u>										
sn	<i>P. aeruginosa</i>	Japón	1988a	9,0	>400	3	--	--	12,5	595
sn	<i>B. fragilis</i>	Francia	1990a	4,3-5,1	--	--	128	>64	128	466
III.- <u>ALPEA de CLASE C: CEFAMICINASAS.-</u>										
CMY-1	<i>K. pneumoniae</i>	Corea Sur	1989c	8,0	4	16	64	256	0,2	40
CMY-2	<i>K. pneumoniae</i>	Grecia	1990c	8,1	128	64	32	256	0,2	43,45
BIL-1	<i>E. coli</i>	Pakistán	1989a	8,8	64	64	16	>64	0,5	445,611
MIR-1	<i>K. pneumoniae</i>	EEUU	1988a	8,4	128	128	64	>256	1	435
MOX-1	<i>K. pneumoniae</i>	Japón	1991a	8,9	64	32	512	--	0,5	236
LAT-1	<i>K. pneumoniae</i>	Grecia	1993c	9,4	>128	64	>128	128	2	577
FOX-1	<i>K. pneumoniae</i>	Argentina	1989a	6,8-7,2	16	--	64	32	8	192
IV.- <u>ALPEA de CLASE D: OXACILINASAS DE ESPECTRO AMPLIADO.-</u>										
OXA-11	<i>P. aeruginosa</i>	Turquía	1991a	6,4	1024	32	32	--	2	211

a: Año de aislamiento; b: las cepas se aislaron en Francia, Bélgica, Inglaterra, Chile o Alemania. No se especifica el origen exacto; c: Año de comunicación; d: origen animal;

<sup>e</sup>: CMI de amoxicilina/ácido clavulánico; <sup>m</sup>: mutante de laboratorio; sn: sin nombrar; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; CTX: cefotaxima; FOX: cefoxitina; IMP: imipenem;

### 2.3.1.- De clase A: oxiiimino- $\beta$ -lactamasas y oxiiiminocefalosporinasas.

Constituyen en la actualidad el grupo más amplio de BIPEA (TABLA 2). Hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> generación y los antibióticos monobactámicos (94). No incluyen en su espectro a las cefamicinas, el moxalactam y los carbapenems y son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (451,453). Conforman, por su espectro hidrolítico y por ser eficazmente inhibidas por el ácido clavulánico, el grupo 2b' de la clasificación de Bush de 1989 (90).

En ocasiones, la presencia de estas BIPEA confiere un nivel de resistencia bajo con halos de inhibición y concentraciones mínimas inhibitorias en el rango de lo clasificado como sensible por diversos organismos internacionales (398,399,400). No obstante, "cierta pérdida de sensibilidad" a cefotaxima o ceftazidima, expresada por CMI entre 0,2 y 1  $\mu\text{g/ml}$  y halos de inhibición inferiores a 30 mm (discos de 30  $\mu\text{g}$ ), la observación en los antibiogramas de un halo de inhibición "ampliado" para las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación o monobactams frente a discos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (prueba de doble difusión en disco) (259), y la sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos provistos de un grupo metoxi en C<sub>6</sub> ó C<sub>7</sub> y a carbapenems, facilitan su identificación presuntiva (252).

Con la excepción de TEM-12 que puede poseer localización cromosómica (599), las BIPEA están codificadas por plásmidos de elevado tamaño (40-300 Kb) (255), que determinan con frecuencia, y de forma simultánea, resistencia a aminoglicósidos (101,451). En algunas ocasiones estas enzimas están codificadas por transposones (227,325) facilitando su diseminación en diferentes replicones (263,532). Por el momento las BIPEA han sido identificadas solo en *Enterobacteriaceae* (252), y aunque es en el género *Klebsiella* y en *E. coli* donde con más profusión se han descrito; también se han caracterizado en *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Serratia*, *Salmonella* (252,451) e incluso y más recientemente en el género *Proteus* (63,157,158,489).

Dentro de este grupo podemos establecer, atendiendo a su origen dos subgrupos; el primero de ellos - oxiiimino- $\beta$ -lactamasas - derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, y el segundo, las relacionadas con las oxiiiminocefalosporinasas de *P. vulgaris* y las  $\beta$ -lactamasas de *K. oxytoca*.

Las oxiiimino- $\beta$ -lactamasas derivan por mutación de las bien conocidas TEM-1 y TEM-2 y SHV-1. Un pequeño cambio en la secuencia aminoacídica, que no afecta a más de 5 aminoácidos (252,322), no solo determina importantes variaciones en el perfil de sustrato y en la afinidad del enzima, ampliando el espectro hidrolítico (94,438), sino que también incide en las características de la proteína, obteniéndose en general una actividad específica menor (89,94) y un pI diferente (252). Hasta la fecha se han identificado más de 40 enzimas derivadas de TEM (TABLA 2), poseen un



pI ácido que oscila entre 5,1 y 6,5, agrupándose fundamentalmente en torno a 5,4, 5,55 y 5,9. La tasa relativa de hidrólisis de la mayoría de estas enzimas es mayor para cefotaxima que para ceftazidima (94), sin embargo las CMI muestran con frecuencia una relación inversa, probablemente por la mejor penetración de la cefotaxima en el espacio periplásmico (410). Las enzimas derivadas de SHV-1 conforman un grupo más reducido, habiéndose diferenciado hasta el momento 5  $\beta$ -lactamasas con pI alcalinos que oscilan entre 6,9 y 8,2. Su eficiencia hidrolítica es mayor para cefotaxima (438) y, con la excepción de SHV-6, comparativamente con las derivadas de TEM, muestran unas CMI más elevadas para ceftazidima, aztreonam y cefotaxima (TABLA 2).

El segundo grupo de  $\beta$ lactamasas de clase A está constituido por las oximiinocefalosporinasas plasmídicas relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *P. vulgaris* subgrupo 2e de Bush (91) y de *K. oxytoca* subgrupo 2b' de Bush (90). Las primeras comprenden las enzimas FEC-1 (355) y FPM-1 (596), que hidrolizan eficazmente, al igual que las cefuroximasas de *P. vulgaris* (91,231,378,503,518), la cefuroxima y cefotaxima y en menor medida la ceftizoxima y ceftazidima. Son inactivadas por el ácido clavulánico e imipenem pero no por la cloxacilina o el aztreonam. La enzima FEC-1, de origen animal, posee un pI de 8,2 y un peso molecular de 48 Kd siendo algo inferior el de FPM-1, pI de 7,2 y peso molecular de 26 Kd. Es de resaltar que esta última se caracterizó en una cepa de *P. mirabilis*, especie en donde son escasas las  $\beta$ lactamasas descritas (63,157,158,489). Aparentemente, ambas enzimas se expresan de forma constitutiva y la frecuencia de conjugación es relativamente elevada;  $4,9 \times 10^{-6}$  a  $2,5 \times 10^{-5}$ .

Recientemente, se han caracterizado dos enzimas, MEN-1 (60) y KH (612,613), que aunque con diferentes pI, 8,4 y 5,25, se relacionan con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *K. oxytoca*. La enzima MEN-1 posee un perfil hidrolítico cefotaximasa y un fenotipo de resistencia similar al generado por la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *Klebsiella* (478). Asimismo, su secuencia N-aminoterminal tiene una alta homología con la  $\beta$ -lactamasa de *K. oxytoca* (15,480). Por otra parte, la enzima KH, muestra una actividad hidrolítica elevada para la cefuroxima, cefotaxima y aztreonam, similar a la encontrada para la K1 de *K. oxytoca* (90,93,155,265,337). Se ha descrito un fenotipo idéntico en cepas de esta misma especie con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de igual pI (478).

Con independencia de las oximiino- $\beta$ -lactamasas y oximiinocefalosporinasas, existe un número relativamente importante de enzimas ( $\beta$ lactamasas de clase A no diferenciadas) con un fenotipo de sensibilidad superponible al de estos dos grupos (TABLA 2). Hasta el momento no se dispone de suficientes datos de actividad hidrolítica o no están secuenciadas. Entre ellas se encuentran algunas que, por sus pI ácidos, se relacionarían con las enzimas de tipo TEM; MJ-1, MJ-2 (143) y con algunas de las  $\beta$ -lactamasas descritas en el género *Klebsiella* (364). Por el contrario FUR (590),

CTX-M (40), CTX-M2 (39) y DJP-1 (440) poseen pI alcalinos que permitirían relacionarlas con las de tipo SHV. Los escasos datos de actividad hidrolítica disponibles las acercaría a las oximiinocefalosporinas. Serán necesarios estudios de secuenciación para su clasificación definitiva.

### 2.3.2.- De clase B: carbapenemasas.

La descripción inicial en *Enterobacteriaceae* de metaloenzimas de codificación cromosómica capaces de hidrolizar el imipenem (619) supuso una sorpresa relativa inferior a la que desató la descripción por Watanabe y cols. (595) en 1991 de una carbapenemasa transferible en *P. aeruginosa*. Suponía la primera  $\beta$ lPEA que hidrolizaba imipenem y la primera  $\beta$ lPEA descrita en *P. aeruginosa*. La alarma inicial ante lo que podía ser un hecho de marcada trascendencia clínica por la amplísima limitación terapéutica que determina y el carácter plasmídico que la distingue, ha sido relativizada por la ausencia de nuevos aislamiento con idénticas características. No obstante, recientemente y aunque no excesivamente documentado, se ha comunicado el aislamiento de 4 cepas de *P. aeruginosa* en Alemania con resistencia transferible al imipenem (243) y la aparición en Inglaterra de la primera cepa de *E. coli* con resistencia a este antibiótico (78). Estos hallazgos están aún por confirmar.

La primera carbapenemasa plasmídica, descrita por Watanabe y cols. (595) en 1991, se caracterizó en Japón en 1988 en un aislamiento de *P. aeruginosa*. Tiene un pI de 9,0 y esta codificada por un plásmido del grupo de incompatibilidad P-9, que transfiere a *P. aeruginosa* pero no a *E. coli*. Confiere resistencia al imipenem (CMI 50  $\mu$ g/ml) y meropenem (100  $\mu$ g/ml), así como a la carbenicilina, ceftazidima, cefoperazona, cefsulodina y moxalactam (> 400  $\mu$ g/ml); por el contrario se muestra más sensible a la piperacilina y el aztreonam (25  $\mu$ g/ml). No es inhibida por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas pero sí por EDTA y pCMB. En estos dos últimos casos la inhibición revierte con la adición de  $Zn^{2+}$  al medio, por lo que puede adscribirse al grupo de las metaloenzimas, siendo muy similar a otras enzimas previamente descritas en *B. fragilis* (620). Es de resaltar, que en esta última especie se han descrito también metaloenzimas transferibles que confieren resistencia a los carbapenems (25) cuando participa un elemento de inserción (466).

### 2.3.3.- De clase C: cefamicinasas.

La incorporación en plásmidos de genes cromosómicos que codifican  $\beta$ -lactamasas relacionadas con AmpC, que hidrolizan sustratos  $\beta$ -lactámicos con un grupo metoxi en la posición 6 de penicilinas - temocilina - y 7 de cefalosporinas -cefamicinas y moxalactam - ha determinado la aparición de una nueva clase de  $\beta$ lPEA. Estas, a las que denominaremos cefamicinasas, en clara referencia a su perfil

hidrolítico, o  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase I (adaptando la terminología a la clasificación de Rychmond y Sykes), constituyen las BIPEA de clase molecular C.

Las primeras descripciones de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase C codificadas por genes incorporados en plásmidos corresponden a las enzimas CEP-1 y CEP-2 (292). La primera de ellas, considerada como una  $\beta$ -lactamasas plasmídica de Clase I de *E. coli* (69) no parece ser tal, ya que el plásmido supuestamente responsable, regularía únicamente la síntesis de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica sin producir enzima alguno. CEP-2, descrita inicialmente como cefalosporinasa (292), presenta un perfil hidrolítico más amplio (90) y ha sido clasificada por Bush dentro del grupo 2b,  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (90). Es en 1989 cuando Bauerfeind y cols. (40) describen por primera vez una BIPEA que hidroliza cefoxitina y otras cefamicinas. Esta  $\beta$ -lactamasa, CMY-1, de pI 8,0 fue caracterizada en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Seúl y posee similares características a la CMY-2, de pI 8,1, identificada en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Grecia (45). Ambas enzimas confieren resistencia a cefoxitina, cefotetan, cefmetazol y moxalactam, además de todos los nuevos  $\beta$ -lactámicos con la excepción de imipenem y meropenem. Solamente el nivel de sensibilidad a la ceftazidima parecen diferenciarlas (TABLA 2). Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas retienen algo de actividad, dependiendo de la combinación a considerar, hecho que las individualiza del resto de las cefamicinasas descritas en las que los inhibidores se muestran ineficaces. Recientemente, ha quedado demostrado la elevada homología de la enzima CMY-2 con AmpC de *C. freundii* (43).

Las enzimas BIL-1 (445) y MIR-1 (435) caracterizadas, respectivamente, en *E. coli* y *K. pneumoniae* y consideradas como prototipos de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase I (441), poseen un fenotipo de resistencia que incluye las amino y carboxipenicilinas, las cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación y asociaciones de  $\beta$ -lactámicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, escapando únicamente los carbapenems a su acción hidrolítica. La enzima BIL-1, de pI 8,8 se caracterizó en Inglaterra en una cepa de *E. coli* de un paciente procedente de Pakistán, tratado previamente con cefotaxima y ampicilina (611). Tiene un perfil de sustrato, eficiencia relativa de hidrólisis y perfil de inhibición similar al de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *E. cloacae* (445). La enzima MIR-1 constituye una excepción desde el punto de vista epidemiológico al ser la única cefamicinasa implicada en una epidemia o brote nosocomial (435). Se identificó en cepas de *K. pneumoniae* aisladas en Providence (EEUU) entre septiembre de 1988 y junio de 1989. Procedían de 11 pacientes en su mayoría quirúrgicos tratados con cefalosporinas de 3ª generación o cefoxitina con una hospitalización prolongada. La secuenciación de un fragmento de 150 pares de bases del gen responsable de la síntesis de la enzima MIR-1 demostró una gran homología (> 90%) con *ampC* de *E. cloacae*. Este gen se alberga en plásmidos transferibles de un tamaño relativamente grande, 40-60 kb, con

diferentes perfiles de restricción aunque pertenecientes todos al mismo grupo de incompatibilidad N. Este hecho, indicaría un posible origen común y posterior dispersión entre las diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

Muy similar a estas  $\beta$ -lactamasas es la enzima MOX-1 (236) identificada en 1991 en una cepa de *K. pneumoniae* en Japón. Confiere, al igual que MIR-1, mayor grado de resistencia al moxalactam que al resto de las cefamicinasas y su pI, 8,9, es muy cercano al de la BIL-1. Su expresión, como la de sus predecesoras se realiza de forma constitutiva. A diferencia de ellas, parece estar relacionada con la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *P. aeruginosa* ya que el gen *bla*<sub>MOX-1</sub> no hibrida con *ampC* de *E. coli* y su región N-amino terminal posee una alta homología con AmpC de *P. aeruginosa* (315).

En contraposición a las anteriores cefamicinasas, cuyos genes responsables se albergan en plásmidos transferibles (40,45,236,435,445), se encuentra la  $\beta$ -lactamasa LAT-1 (577). Esta enzima, identificada en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Grecia, se alberga en un plásmido de pequeño tamaño (5,3 MDa) no transferible pero que se moviliza a través de otro plásmido de la misma cepa de mayor tamaño (72 MDa) y que, curiosamente, sintetiza la enzima SHV-5. El fenotipo de resistencia y su perfil de sustrato (577) es similar al de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase I, aunque no existe reacción positiva al hibridar con una sonda intragénica del gen *ampC* de *E. cloacae*.

Por último, la enzima FOX-1, identificada en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en 1989 en Argentina (191) y caracterizada por González-Leiza (192) en nuestro laboratorio, posee dos variantes moleculares con diferente pI, 6,8 y 7,2, pero con idéntico perfil de sustrato, similar al de las cefalosporinasas de clase I (503). Esta enzima, que también confiere resistencia a cefoxitina (191), presenta una homología en la secuencia de nucleótidos del 43% con *ampC* de *Serratia* y 49% con el de *P. aeruginosa* (192).

#### 2.3.4.- De clase D: oxacilinasas de espectro ampliado.

Un alto nivel de resistencia a la ceftazidima (512  $\mu$ g/ml) en comparación con la cefotaxima (64  $\mu$ g/ml) y la resistencia a penicilinas, aztreonam y meropenem, pero no al imipenem, permitió la detección e identificación de una nueva  $\beta$ -lactamasa - OXA-11 - en una cepa de *P. aeruginosa* de origen clínico (211). Aislada en Turquía en 1991 de un hemocultivo, presenta un plásmido transferible a *P. aeruginosa* pero no a *E. coli* que codifica una  $\beta$ -lactamasa de expresión constitutiva de pI 6,4. Este valor es cercano a las  $\beta$ lactamasas derivadas de TEM pero a diferencia de ellas el enzima

se comporta como una potente oxacilinasas. La secuenciación del gen que la codifica permitió establecer una estrecha relación de esta con la PSE-2 (OXA-10), diferenciándose en tan solo 2 aminoácidos. Asimismo, el promotor está muy distanciado del habitual en su ancestro y es parecido al de *Pseudomonas putida*.

La reciente caracterización de esta "oxacilinasas de espectro ampliado",  $\beta$ IPEA de clase D ha permitido completar el esquema, uniéndose a las ya descritas  $\beta$ IPEA de clase A, B y C. La existencia de este fenotipo parece ser un problema local en Turquía (211) por lo que su trascendencia clínica es menor que la de otras  $\beta$ IPEA.

### 2.3.5.- $\beta$ -lactamasas plasmídicas de tipo TEM con resistencia a inhibidores de $\beta$ -lactamasas.

Dentro de las  $\beta$ IPEA es posible considerar a aquellas enzimas, caracterizadas hasta la fecha únicamente en *E. coli*, que confieren resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) y que al igual que las oximinob- $\beta$ -lactamasas derivan por mutación de TEM-1 (66,584). Sin embargo, a diferencia de las  $\beta$ IPEA derivadas de TEM, no confieren resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación e incluso las cepas de *E. coli* que las albergan tienen la particularidad de ser más sensibles a la cefazolina que las cepas que codifican la propia TEM-1 (584).

Su presencia fue anticipada en hipótesis por Bush en 1989 (89) y confirmada ese mismo año en mutantes "in vitro" por Oliphant y Struhl (424). Posteriormente Manavathu y cols. (332,333,334) y Delaire y cols. (141) obtuvieron mutantes con similares características, confirmando que era suficiente la modificación de un solo aminoácido en la secuencia de la  $\beta$ -lactamasas TEM-1 para obtener una pérdida de actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Los primeros ejemplos clínicos se obtuvieron en dos cepas de *E. coli* aisladas en Francia en 1991 por Belaouaj y cols. (48) caracterizándose dos  $\beta$ -lactamasas distintas, TRI-1 y TRI-2, ambas con un pI de 5,2, en donde la arginina de la posición 241 se sustituía por cisteína y serina, respectivamente (49,584). Este caso no parece ser una situación aislada ya que recientemente se ha comprobado que la incidencia de este tipo de cepas procedentes de infecciones urinarias es elevada tanto en el medio hospitalario (14,7%) como en el extrahospitalario (25,1%) (225), presentando una mayor variedad de enzimas en cuanto a sus pI, 5,2, 5,3, 5,4 y 5,5 (79,535). Asimismo, en Escocia Thomson y Amyes (569) identificaron en *E. coli* una  $\beta$ -lactamasas de pI 5,25 (TRC-1) resistente al ácido clavulánico y otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas que al ser expuesta a concentraciones de 512  $\mu$ g/ml de amoxicilina revierte la mutación a TEM-1 (570). Es de resaltar que estos mismo autores obtienen la misma  $\beta$ -lactamasas TRC-1 al exponer una cepa de *E. coli* con una TEM-1 a concentraciones subinhibitorias de

amoxicilina/clavulánico (571). De nuevo se corrobora la aparición de nuevas  $\beta$ -lactamasas por la presión selectiva ejercida por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

En España, la primera cepa de estas características se obtuvo en 1992 de un paciente con infección urinaria adquirida en la comunidad y que había sido tratado durante dos semanas con amoxicilina/ácido clavulánico (5). En este caso, la  $\beta$ -lactamasa implicada IRT-3, poseía una doble mutación: metionina de la posición 67 por isoleucina (cambio responsable de la resistencia a los inhibidores) y metionina de la posición 180 por treonina, siendo el pI igual al de TEM-1 (66). La denominación de esta  $\beta$ -lactamasa como IRT ("inhibitors-resistant TEM  $\beta$ -lactamases") corrige la denominación anterior TRI ("TEM-resistant to  $\beta$ -lactamase inhibitors") (584) ya que existía una publicación previa de una  $\beta$ -lactamasa TRI que hace referencia a la resistencia a ceftriaxona (71).

Por el momento no existen ejemplos clínicos de enzimas derivadas de SHV con resistencia a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, esta posibilidad no está lejos de ser una realidad, ya que Bonomo y cols. (71) obtuvieron mutantes de la enzima OHIO-1,  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro relacionada filogenéticamente con las de tipo SHV (529), con resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

### **3.- BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.**

#### **3.1. Alteraciones de la secuencia-base.**

Las bases genéticas de las BIPEA se han ido dilucidando progresivamente. Poco después del hallazgo de SHV-2 y TEM-3 (CTX-1) se demostró por técnicas de hibridación que ambas enzimas derivaban, respectivamente, de SHV-1 y TEM-2 (279,548). Son suficientes pequeñas modificaciones en la secuencia nucleotídica para producir cambios importantes en las características enzimáticas de la  $\beta$ -lactamasa. Un cambio en un solo aminoácido en la posición 236, glicina por serina, en la secuencia de SHV-1 determina la aparición de la enzima SHV-2 y 2 mutaciones a partir de la secuencia de TEM-2, lisina por glutámico en la posición 102 y serina por glicina en la posición 236, la BIPEA TEM-3.

Estos cambios aminoacídicos no solo afectan al pI del enzima, sino que también influyen en la estructura terciaria del mismo y por lo tanto en el acceso de los sustratos a su centro activo. En consecuencia, varían las propiedades cinéticas del enzima: perfiles de sustrato e inhibición y

eficiencia hidrolítica (94,288,551). Aunque esta demostración constituyó un hallazgo de capital importancia supuso una sorpresa relativa. En 1976 **Hall y Knowles** (210) por selección química con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina obtuvieron un mutante de TEM-1 con mayor eficiencia hidrolítica sobre la cefalosporina C. Años más tarde, **Healey** (221) demostró que se trataba de un mutante que poseía un residuo de alanina en la posición 237. Asimismo, **Sigal y cols.** (530) y **Dalbadie-McFarland y cols.** (138) obtuvieron en 1982 mutantes relacionados con las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM que afectaban directamente al centro activo.

La demostración fehaciente de que estas  $\beta$ -lactamasas derivan de otras enzimas conocidas estuvo determinada por la selección "in vitro" de mutantes con idénticas características a las BIPEA y obtención de estas mismas enzimas por mutagénesis dirigida. En este sentido, en 1985 **Kliebe y cols.** (279) obtuvieron enzimas derivadas de SHV-1 con idénticas características que SHV-2 y **Payne y cols.** en 1989 (443) obtuvieron, partiendo de cepas de *E. coli* con TEM-1, en medios selectivos con ceftazidima (0,7  $\mu$ g/ml), mutantes resistentes a este antibiótico. Estos tenían  $\beta$ -lactamasas de pI 5,3 y 5,41 con características cinéticas y un perfil de resistencia coincidente con BIPEA ya descritas (438,442,444). Con respecto a la mutagénesis dirigida, son diversos los trabajos que confirman esta hipótesis; **Schultz y Richards** (519) modificaron la posición 69, adyacente al centro activo de serina de la enzima TEM-1 y **Healey y cols.** (221) la posición 235. **Sougakoff y cols.** (547) abordaron en 1988 la construcción de enzimas con modificaciones dobles; lisina por glutamina en la posición 102 y serina por glicina en la posición 236 de TEM-1. Más recientemente, **Sowek y cols.** (551) y **Blázquez y Baquero** (65) partiendo de TEM-1 y conociendo la secuencia de diversas BIPEA han reproducido por mutagénesis dirigida las enzimas de origen clínico.

Hasta el momento se conoce, total o parcialmente, la secuencia de 20 BIPEA de tipo TEM y 4 derivadas de SHV [Tabla 3, la numeración de los residuos aminoácidos se ha realizado siguiendo el esquema de **Sutcliffe** para la TEM-1(558)]. En el análisis de su secuencia se observa que tan sólo unas pocas posiciones, 8 en las derivadas de TEM y 3 en las de tipo SHV, se ven afectadas. Además, los cambios en cada posición se producen por un aminoácido concreto, con la única excepción de la arginina en la posición 162 que puede ser substituida por serina o histidina. De no ser así, las posibilidades serían infinitas y numerosas las  $\beta$ -lactamasas. Esta posibilidad queda, sin duda, limitada por la estabilidad de la propia molécula y la viabilidad a nivel de selección (65,551). TEM-12,17,19 y SHV-2 tienen una sola mutación; TEM-6,7,10,13,15,18,23,26, SHV-3 y 5, dos cambios aminoacídicos; TEM-4,8,9 y 14, tres y TEM-24, cuatro mutaciones (TABLA 3).

**TABLA 3.-** Base molecular de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado: TEM y SHV.

BIPEA	pI	Posición aminoacídica <sup>a</sup>									Referencia
		19	37	102	162	203	235	236	237	261	
TEM-1	5,4	Leu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ala	Gly	Glu	Thr	558
TEM-2	5,6		Lys								33
TEM-3	6,3		Lys	Lys				Ser			548
TEM-4	5,9	Phe		Lys				Ser		Met	323
TEM-5	5,55				Ser		Thr		Lys		549
TEM-6	5,9			Lys	His						323
TEM-7	5,41		Lys		Ser						111
TEM-8	5,9		Lys	Lys	Ser			Ser			324
TEM-9	5,5	Phe		Lys	Ser					Met	323
TEM-10	5,57				Ser				Lys		289
TEM-11	5,7		Lys		His			?			323
TEM-12	5,25				Ser						323
TEM-13	5,6		Lys							Met	323
TEM-14	6,3		Lys	Lys				Ser		Met	323
TEM-15	6,0			Lys				Ser			323
TEM-16	6,3		Lys	Lys	His						323,129
TEM-17	5,9			Lys							323
TEM-18	6,3		Lys	Lys							323
TEM-19	5,4							Ser			323
TEM-23	5,58				Ser				Lys		585
TEM-24	6,5		Lys	Lys	Ser		Thr		Lys		129
TEM-26	5,58			Lys	Ser						401
SHV-1	7,6		Gln	Asp	Arg	Arg	Ala	Gly	Glu	Leu	34
SHV-2	7,6							Ser			31
SHV-3	6,98					Leu		Ser			406
SHV-4	7,75					Leu		Ser	Lys		446
SHV-5	8,2							Ser	Lys		62

<sup>a</sup>: los residuos aminoacídico se numeran según lo establecido por Sutcliffe (558) para la enzima TEM-1. La numeración de las enzimas de tipo SHV es similar pero con dos unidades más.

La enzima TEM-1 difiere de TEM-2 en tan solo un aminoácido (9); mediante un cambio en la posición 37, lisina por glutamina, que no confiere incremento en los valores de CMI de la ceftazidima y cefotaxima (251). Teniendo en cuenta esta substitución, 9 de las BIPEA poseen este cambio y podría postularse que derivan de TEM-2 (TEM-3,7,8,11,13,14,16,18 y 24), mientras que el resto derivarían de TEM-1 (TEM-4,5,6,9,10,12,15,17,19,23 y 26). El hecho de que existan tantas BIPEA derivadas de TEM-2, pese a la baja incidencia de ésta (363,607), podría estar en relación con la mayor eficacia del promotor de TEM-2 (547) que determinaría una mayor capacidad de selección de las BIPEA derivadas de TEM-2. La substitución de la metionina por treonina en la posición 261 no afecta el espectro hidrolítico; por ello TEM-13, que presenta esta substitución, además de la lisina por glutamina en la posición 37, posee unas características similares a TEM-2 (322). Esta circunstancia explicaría que esta  $\beta$ -lactamasa se halla detectado solamente en una cepa de *M.*



*morganii* (322) e, incluso, que alguna de las enzimas de pI 5,6 "identificadas" como TEM-2 se trate realmente de TEM-13, en alguna cepa concreta.

Los dos cambios anteriormente referidos en las posiciones 37 y 261 no afectan a las características fenotípicas del enzima a no ser que se acompañen de otras sustituciones en otro lugar de la proteína (65). Este hecho queda, asimismo, demostrado al comparar la secuencia aminoacídica de TEM-3 y TEM-4; ambas presentan cambios en los residuos 102 (lisina por glutamina) y 236 (serina por glicina) (547,549), diferenciándose tan solo en la sustitución que tiene TEM-4 en la posición 261 (metionina por treonina) y TEM-3 en la posición 37 (lisina por glutamina). Su fenotipo de resistencia es común (251) y presentan similares características cinéticas (94,437). Además TEM-4 (549), al igual que TEM-9 (322), presenta una sustitución críptica en la posición 19 (fenilalanina por leucina) que corresponde a la región del péptido líder lejos del centro activo de la enzima, y que es segregado en el proceso de exportación de la proteína al periplasma (453).

El análisis de los diferentes residuos por Sougakoff y cols. (547) y Collatz y cols (111) y los trabajos de mutagénesis de Soweck y cols. (551) han demostrado que el cambio a nivel de las posiciones 102 y 162 afectan a la hidrólisis de la ceftazidima y los monobactámicos (547,551), mientras que la sustitución del aminoácido 236 a la de cefotaxima (547). Es por ello que las enzimas con modificaciones en los residuos 102 ó 162 y 236, TEM-3,4 y 8 muestran valores de CMI elevados para ambos antibióticos. Las sustituciones en la posición 102 sin modificaciones en el aminoácido 236, como sucede en las enzimas TEM-6 y TEM-26, confieren mayor resistencia a la ceftazidima que a la cefotaxima. Por el contrario, los cambios en el residuo 236 en ausencia de modificaciones en la posición 102 afectan en mayor medida a la CMI de la cefotaxima; ejemplos de ello son las enzimas derivadas de SHV-1 (239,290) que presentan unos valores de CMI algo más elevados para la cefotaxima que los de la ceftazidima (TABLAS 2 y 3).

La numeración de los distintos residuos aminoacídicos se ha efectuado tomando como referencia el orden establecido por Sutcliffe para TEM-1 (558), por lo que las posiciones reales de las enzimas de tipo SHV son la indicadas con dos unidades más (TABLA 3). SHV-2 presenta una única sustitución en la posición 236 (glicina por serina) (31), si bien en algunos trabajos se han encontrado otras modificaciones en las posiciones 31 (glutamina por leucina) (180) y 17 (triptófano por leucina) (463), esta última en el péptido líder, que no afectan a la actividad enzimática. SHV-3 (406), SHV-4 (446) y SHV-5 (62) se diferencian de ésta sólo en las posiciones 203 y 237 (TABLA 3). Huletsky y cols. (239) comprobaron que era necesario el cambio simultáneo de las posiciones 236 y 237 (SHV-4 y SHV-5) para incrementar la hidrólisis de la ceftazidima.

Muy diferentes son las circunstancias que afectan a las BIPEA que derivan de TEM-1 y confieren resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Por el momento se ha demostrado en cepas de origen clínico que los cambios en las posiciones 241, arginina por serina o cisteína (49,584), y 67, metionina por isoleucina (66), son importantes para la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. La substitución, por mutagénesis dirigida, de la arginina 241 por lisina, aminoácido análogo, no afecta las características cinéticas de la TEM-1 (48,332,333,334). Por el contrario, cambios realizados con la misma técnica de la metionina 67, por valina, leucina o isoleucina, interfieren en la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (141,424). Esta última posición es anterior al centro activo del enzima (serina 68) por lo que se ha postulado que ésta sea la causa de la pérdida de afinidad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. El ácido clavulánico pierde más su actividad inhibidora que el sulbactam o el tazobactam; por otra parte la actividad del enzima sobre otros substratos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo cefalosporinas de 3ª generación, podría mantenerse o, incluso disminuir (66,141). Asimismo, estudios "in vitro" realizados con  $\beta$ -lactamasas relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas de tipo SHV confirman estos hallazgos (71).

**Mabilat y Courvalin** en 1990 (322) anticiparon que la modificación de la secuencia proteica no sería una exclusiva de las oximiino- $\beta$ -lactamasas sino que con toda seguridad emergerían variantes en otras enzimas plasmídicas, como las oxacilinasas (grupo 2d de **Bush**) y carbenicilinasas (grupo 2c), que ampliarían el espectro hidrolítico. En este sentido, la OXA-11 que pertenece a la clase molecular D es consecuencia de dos substituciones a partir de la PSE-2 (OXA-10), serina por asparagina en la posición 143 y aspártico por glicina en el residuo 157 (211). Con ello, se modifican las características cinéticas del enzima y elevan los valores de CMI, en particular el de ceftazidima.

Por otra parte, y aunque no se trate de cepas clínicas sino de variantes de laboratorio obtenidos por mutagénesis, **Bejaoui y Levesque** (47) modificaron la secuencia de la carbenicilinasas *bla*<sub>CARB-4</sub>. La doble substitución, serina por arginina en la posición 234 y serina por glicina en la posición 238 altera las características cinéticas y eleva la resistencia a la ceftazidima. Esta posibilidad tendría un impacto clínico importante por tratarse CARB-4 de un enzima comúnmente encontrada en *P. aeruginosa* (363,607). Por otra parte, **Payne** (438) obtuvo "in vitro" mutantes de la carbenicilinasas PSE-4 (CARB-1) que incrementan el valor de la CMI de la ceftazidima.

Finalmente, las cefamicinasas surgen a partir de la integración de genes de tipo *ampC* en plásmidos y aunque las secuencias estudiadas, MIR-1 (435), CMY-2 (43) y MOX-1 (236), se relacionan con *ampC* de *E. cloacae*, *C. freundii* y *P. aeruginosa*, la homología no es total. Una de estas cefamicinasas, FOX-1, secuenciada en su totalidad por **González-Leiza** (190) demuestra tan

sólo una homología de su secuencia nucleotídica del 43% con *ampC* de *Serratia* y 49% con el de *P. aeruginosa*.

### 3.2. Configuración estructural de la proteína.

Las enzimas TEM-1 y SHV-1 poseen entre sí un 68% de similitud en su secuencia aminoacídica (34,558), presentando un centro activo de serina en las posiciones 68 y 66, respectivamente. Al igual que la  $\beta$ -lactamasa PC1 de *S. aureus* y la del *Bacillus licheniformis* pertenecen a la clase A de la clasificación de Ambler (8) con una zona altamente conservada en los aminoácidos que se sitúan, en su estructura terciaria, en las inmediaciones del centro activo (228,267,557). Las modernas técnicas de cristalización y el análisis de la estructura tridimensional (281,551) han permitido establecer hipótesis y "visualizar" las interacciones que se desarrollan en el centro activo entre los diferentes residuos de la proteína y el sustrato y las consecuencias de las mutaciones o sustituciones aminoacídicas. Tomando como referencia las  $\beta$ -lactamasas PC1 de *S. aureus* (228) y TEM-1 de *E. coli* (557) las posiciones 102, 162, 235, 236 y 237 se sitúan espacialmente en las proximidades del centro activo. El aumento del espectro hidrolítico está determinado por la sustitución de estos residuos. Sin embargo, al ser generalmente un cambio por aminoácidos de mayor volumen o diferente carga, con frecuencia se produce un descenso en la eficiencia hidrolítica (551).

El modelo mejor conocido de las BIPEA es el de las enzimas derivadas de TEM en las que se ha realizado un análisis puntual de las diferentes sustituciones. Asimismo, estudios recientes en sustituciones realizadas sobre la  $\beta$ -lactamasa OHIO-1 (281), variante de SHV-1 (529), y los trabajos de Lee (290) y Huletsky (239) en BIPEA de tipo SHV confirman los trabajos realizados con las BIPEA de tipo TEM.

Un cambio en el residuo 236 (serina por glicina) permite la interacción de la proteína con el grupo oxima de las cefalosporinas y monobactámicos (239,288,453,551). Asimismo, se ha demostrado que la presencia de la lisina en la posición 102 de las BIPEA de tipo TEM ó en la posición 237 en ambas familias, TEM y SHV, facilita la formación de complejos con los grupos negativos de la cadena lateral de la ceftazidima (239,446). La interacción electrostática (enlace covalente) entre el grupo oxima de la ceftazidima o el aztreonam puede ser establecida con cualquiera de los substituyentes de lisina de las posiciones 102 ó 237, gracias a la rotación del grupo carboxilo de la cadena lateral de estos dos antibióticos.

Por otra parte los puentes de hidrógeno entre el grupo oxima, nitrógeno u oxígeno, y el grupo amino del extremo de la lisina son también posibles, particularmente con la lisina de la

posición 102. Este enlace no covalente aumenta la cinética enzimática, produciéndose con mayor facilidad en aquellos antibióticos que, como la cefotaxima, carecen de grupo carboxilo en su cadena lateral (551).

Otras posiciones como la 162 (arginina) está altamente conservada entre las  $\beta$ -lactamasas de clase A (267). Su substitución por serina determina de una parte el alejamiento del residuo del centro activo (551), pero por otra un mayor número de grupos hidroxilos libres que aumentan las posibilidades de unión a los substratos (111). Por ello, su participación en el ataque al antibiótico  $\beta$ -lactámico no está del todo determinado.

El análisis tridimensional del resto de las BIPEA (clases B, C y D) es un camino a desarrollar. Sin duda el avance en las técnicas de modelización y estudio de la "realidad virtual" harán posible la estructuración de modelos aproximativos que prevean, incluso, las posibilidades y consecuencias de nuevas mutaciones y su interacción con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

### 3.3. Localización de los genes.

El mismo año en que Shah y Stille describieran en Alemania (523) las primeras cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con resistencia a cefotaxima y sensibilidad a cefoxitina, Knothe y cols. (280) documentaron la transferencia de este patrón a otras cepas de *Enterobacteriaceae*, evidenciando que se trataba de un mecanismo de naturaleza plasmídica.

Con la excepción de TEM-12, enzima que también se ha localizado en el cromosoma bacteriano (599), todas las BIPEA son codificadas por plásmidos, generalmente, de elevado tamaño (40-300 Kb) (255) y que determinan resistencia a múltiples antibióticos. Estos plásmidos pertenecen a unos pocos grupos de incompatibilidad M,C,FI y HI2 (16,255,437,449), pudiéndose encontrar una misma  $\beta$ -lactamasa en diferentes replicones (63,196,252,255,473). Esta posibilidad y el estudio de una cepa de *K. pneumoniae* y otra de *E. coli* de un mismo paciente (532), ambas con idéntica BIPEA - CAZ-7 (TEM-16) -, permitió constatar la hipótesis de que estos genes estuviesen integrados en transposones. En este caso, la cepa de *K. pneumoniae* tenía un plásmido de 85 Kb del grupo de incompatibilidad Inc7 ó M con genes de resistencia para la amicacina y gentamicina, mientras que la cepa de *E. coli* tenía un plásmido con un tamaño superior a 150 Kb del grupo Inc6 ó C que confería resistencia a la amicacina pero no a gentamicina y tenía integrado el gen *bla*<sub>TEM-1</sub>. Hibridaciones con diferentes sondas mostraron que el gen responsable de la síntesis de CAZ-7, los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *aacA4* y una secuencia de inserción se localizaban en un fragmento de 20 Kb común

en ambos plásmidos (532). La transponibilidad fue confirmada al lograrse la transferencia recíproca de los diferentes genes de resistencia entre los plásmidos de 85 y 150 Kb.

Anteriormente, solo se había documentado la presencia del gen *bla*<sub>TEM-12</sub> en un transposón de 4,8 Kb, presumiblemente idéntico al Tn3 (Tn4) (255). Con posterioridad Heritage y cols. (227) demostraron que este mismo gen podía también encontrarse en un transposón de 7 Kb (Tn841) relacionado con el Tn1 que generalmente posee el gen *bla*<sub>TEM-2</sub>. Por su secuencia nucleotídica el gen *bla*<sub>TEM-12</sub> parece haber evolucionado directamente a partir de *bla*<sub>TEM-1</sub>, que como se sabe, está generalmente asociado al Tn3 (55).

Por otra parte, Jacoby y Sutton (255) en un amplio estudio con numerosas BIPEA (TEM-3,4,5,6,7,8,9,12,26, MGH-1, SHV-2,3 y 4), algunas de ellas en diferentes replicones, no consiguieron demostrar la transponibilidad de las mismas. No obstante las secuencias vecinas de los genes responsables de las BIPEA TEM-3,4,6,7,8,9, y 12 contenían el gen *tnpR* que forma parte del transposón Tn3. Quedaba así constatado que al menos un gen de la maquinaria de transposición estaba presente, desconociéndose la ubicación o funcionalidad del resto de los genes integrantes de este transposón.

Mabilat y cols. (325) han confirmado, mediante estudios de hibridación con sondas específicas de los genes *tnpA* y *tnpR* (integrantes de transposones de tipo Tn3), *tnpA* y *tnpI* (integrantes de transposones del tipo Tn21), *aacA4* y de la secuencia de inserción IS15, que algunas de las BIPEA de tipo TEM se asocian con transposones de tipo Tn3, si bien en algunos casos su estructura es incompleta. La delección en estas secuencias ha sido previamente documentada (20,145,226), perdiéndose con ello la capacidad de transposición. Asimismo, Mabilat y cols. (325) demostraron que el gen *bla*<sub>TEM-3</sub>, del plásmido pCFF04, está localizado en una copia incompleta del Tn1 interrumpido por secuencias relacionadas con transposones de la clase II (Tn3). Esta copia del Tn1 está a su vez insertada en el gen de la transposasa de un transposón relacionado con el Tn21 que contiene además un integrón que expresa el gen *aacA4*.

Estos hallazgos, el que no siempre las enzimas TEM-1 ó TEM-2 sean transponibles (183) y, por otra parte, que aún se discuta si los genes que codifican SHV-1 están mediados o no por transposones, redundan en el bajo porcentaje de BIPEA caracterizadas en transposones. Indirectamente se podría deducir que la eficiencia del mecanismo de transposición en la diseminación de los genes de las BIPEA es relativamente baja. Como se ha dicho la mayor parte de las BIPEA están asociadas a plásmidos pertenecientes a un número limitado de grupos de incompatibilidad (16, 255,437,449). Son estos plásmidos de carácter transferible (plásmidos transferibles) los que facilitan

la diseminación de los genes responsables de la codificación de las  $\beta$ lPEA. En este sentido se ha responsabilizado a un mismo plásmido, identificado en diversas especies de *Enterobacteriaceae*, de una o varias epidemias (167,401,481). Asimismo, son varias las ocasiones en las que se ha encontrado una misma  $\beta$ lPEA en distintas especies aisladas de un mismo paciente (16,532), indicando la posibilidad de transferencia "in vivo" y, con la excepción de unos pocos casos (167,259,401,451), es relativamente fácil obtener transconjugantes "in vitro" (451).

Una excepción del tipo de plásmidos que vehiculizan las  $\beta$ lPEA lo constituye el pSLH52 que contiene el gen que codifica la enzima TEM-22 (18). Este plásmido posee un tamaño de tan solo 15 kb, no transfiere por conjugación y carece de otros genes de resistencia. A juicio de los autores este hecho condicionó la nula dispersión de esta enzima en el hospital donde se encontró.

El paso de un gen productor de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica a un plásmido no es un hecho frecuente, aunque existen diversos ejemplos como el del gen *bla*<sub>SHV-1</sub> o el de la  $\beta$ -lactamasa CEP-2 (292). Las cefamicinasas, a diferencia de las oximiino- $\beta$ -lactamasas que se han generado por mutación de otras enzimas ya existentes, provienen de la movilización e integración de genes cromosómicos en plásmidos. Por el momento se desconoce el mecanismo por el cual se ha producido este proceso aunque es posible que se haya desarrollado a través de la transposición, sin excluir que además haya tenido lugar alguna mutación adicional. La mejor demostración es la  $\beta$ -lactamasas MIR-1, supuestamente generada por la adquisición del gen *ampC* de *E. cloacae* por plásmidos del grupo N, unos conjugativos (Tra<sup>+</sup>) y otros no (Tra<sup>-</sup>) (435). El tamaño de los plásmidos que albergan estas cefamicinasas es variable y oscilan entre las 180 kb de MOX-1 y las 8 kb de LAT-1 (236,577). Todas las cefamicinasas, excepto LAT-1 (577), se encuentran codificadas en plásmidos transferibles. La cefamicinasa LAT-1 se moviliza merced a la acción de otro plásmido de mayor tamaño presente en la cepa salvaje y que circunstancialmente codifica una  $\beta$ lPEA con un pl similar a SHV-5.

Otros ejemplos de la integración de genes productores de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas en plásmidos son las  $\beta$ lPEA relacionadas con las de *K. oxytoca*: MEN-1 y KH (60,613), y *P. vulgaris*: FEC-1 y FPM-1 (355,596). Los plásmidos en que se localizan son de variado tamaño y no siempre fue posible obtener transconjugantes con idéntico fenotipo de resistencia. El plásmido con la  $\beta$ -lactamasas KH no es conjugativo, transfiriéndose únicamente la resistencia por electroporación (613).

La única carbapenemasa de naturaleza plasmídica descrita en *P. aeruginosa* (595) se alberga en un plásmido de 31 MDa del grupo de incompatibilidad P-9 que no transfiere por conjugación a cepas de *E. coli* pero sí a *P. aeruginosa*. Esta ausencia de transferencia a *E. coli* es compartida con

la OXA-11 que está vehiculizada en un plásmido de 100 MDa y fue identificada en una cepa de *P. aeruginosa* (211).

### 3.4. Genes de resistencia asociados.

Los plásmidos que albergan los genes responsables de la codificación de las BIPEA son generalmente de gran tamaño, pudiendo coexistir con genes de resistencia a otros antimicrobianos (255,259,449,451, 532,541) y en ocasiones a metales pesados (255). El patrón de resistencia incluye: aminoglicósidos, tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol. En numerosas ocasiones se puede encontrar más de un marcador de resistencia junto a la BIPEA, lo que limita las opciones terapéuticas en el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos con estas enzimas.

El mecanismo de resistencia más comúnmente asociado a las BIPEA es la producción de enzimas modificantes de aminoglicósidos, contrasfiriendo con aquellas en la mayoría de las ocasiones (166,451). Mediante estudios de hibridación o análisis enzimático (perfil de sustrato) se han caracterizado diversas enzimas modificantes de aminoglicósidos asociadas a las BIPEA: AAC(6')IV y AAC(3)I junto a TEM-3, TEM-16 (CAZ-7) y SHV-3 (16,406,449,532), AAD(3'')(9) con TEM-3 y SHV-2 (166,449), AAC(3)II con TEM-4 y SHV-2 (166,437), AAC(3)V, AAC(6')I y APH(3')I con SHV-2 (166) y AAC(3)V, AAC(6')I, ANT(2''), ANT(3'') y APH(3')IV con una BIPEA de pl 5,4 identificada en una cepa de *P. mirabilis* (489). Por este motivo, los fenotipos de resistencia a aminoglicósidos pueden ser diferentes pudiendo incluir resistencia a amicacina y/o gentamicina.

La terapia combinada de cefalosporinas de 3ª generación y aminoglicósidos es uno de los factores más importantes ligado a la diseminación de estas  $\beta$ -lactamasas (539). En Francia se ha relacionado el hallazgo de BIPEA en asociación con la enzima AAC(6')IV, que determina resistencia a amicacina, tobramicina, netilmicina y neomicina, con el consumo de amicacina más cefotaxima o amicacina más ceftazidima (19,127,259,449).

Generalmente las cepas con BIPEA, particularmente oximinob- $\beta$ -lactamasas, se aíslan en enfermos ingresados en unidades de cuidados intensivos y servicios quirúrgicos (127,451,538) por lo que se eleva la probabilidad de que presenten, simultáneamente, otros mecanismos de resistencia no relacionados con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La codificación de estos puede realizarse en el mismo plásmido, en otros diferentes, o directamente en el cromosoma bacteriano. La resistencia a quinolonas, también ha sido documentada en estas cepas en un porcentaje variable (19,128,285) que en ocasiones supera el 70% de los aislamientos (128).

Otras  $\beta$ LPEA también se han asociado con la resistencia a otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos: las cepas con las cefamicinasas CMY-1 y BIL-1 cotransfirieron la resistencia a tetraciclina y cloranfenicol (40,611), MIR-1 lo hizo para las tetraciclinas y los metales pesados (435) y MOX-1 únicamente para las tetraciclinas (236). En el caso particular de la CMY-1 se constató, asimismo, la resistencia al sulfametoxazol y se caracterizó la enzima AAC(6')I tanto en la cepa salvaje como en los transconjugantes (40). Esta acetiltransferasa confiere resistencia a ampicilina y tobramicina pero no a gentamicina (82). Por otra parte, la carbapenemasa descrita en *P. aeruginosa* cotransfirió la resistencia al imipenem junto con la de gentamicina y sulfamidas (595), siendo más amplio el perfil de resistencia asociado a la única oxacilinasas de amplio espectro descrita (OXA-11) que incluye cloranfenicol, sulfamidas, ampicilina, tobramicina, gentamicina y metales pesados (211). Además, esta última  $\beta$ -lactamasa se caracterizó en una cepa de *P. aeruginosa* resistente a la ciprofloxacina.

#### 4.- EXPRESION DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

##### 4.1.- Aspectos genéticos.

La expresión de las  $\beta$ LPEA se realiza de forma constitutiva, no habiéndose demostrado fenómenos de inducción o de hiperproducción por desrepresión genética. La hiperproducción enzimática descrita para TEM-1 (251) y SHV-1 (447) está, generalmente determinada por la presencia de numerosas copias de los plásmidos que las codifican, elevándose la cantidad de enzima. Bush surgió en 1989 (89) la posibilidad de que las  $\beta$ LPEA estuviesen localizadas en plásmidos multicopia, sin embargo esta afirmación queda cuestionada por el gran tamaño de los plásmidos que las contienen (255). Por otra parte, la amplificación de un gen productor de  $\beta$ LPEA solo ha sido evidenciada para SHV-3 (407). El perfil de restricción plasmídico y la hibridación con una sonda específica para SHV-3 demostró la repetición del gen *bla*<sub>SHV-3</sub> en los transconjugantes obtenidos por selección con cefotaxima, en comparación con los obtenidos al seleccionar con kanamicina. Asimismo, se constató un incremento de la CMI de cefotaxima (50  $\mu$ g/ml frente a 0,5  $\mu$ g/ml).

Con independencia de estas dos cuestiones y a pesar de que alguna de las  $\beta$ LPEA descritas provengan de la incorporación de genes cromosómicos responsables de la codificación de enzimas inducibles (oxiiminocefalosporinasas relacionadas con *P. vulgaris* y cefamicinasas relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase I) no se ha demostrado en ellas el carácter de inducibilidad.



Un aspecto importante en la expresión de las  $\beta$ -lactamasas es el relacionado con los promotores. Sougakoff y cols. (549) demostraron, estudiando la secuencia de los promotores de BIPEA derivadas de TEM, que el promotor de *bla*<sub>TEM-4</sub> y *bla*<sub>TEM-5</sub> es similar al que presenta el transposón TnI, responsable de la síntesis de la enzima TEM-2. En este caso existe un cambio en el nucleótido 32 que determina, con respecto al Tn3 (que sintetiza *bla*<sub>TEM-1</sub>) una duplicación y solapamiento de su secuencia, haciéndolo más eficiente. Chen y Clowes (135) demostraron que con ello se incrementa de seis a diez veces la producción de la  $\beta$ -lactamasa y elevan los valores de las CMI para las cefalosporinas de 3ª generación. Similar situación, demostrada por Mabilat y cols. (323), acontece con la  $\beta$ -lactamasa RHH-1 (TEM-9).

Con respecto a las  $\beta$ -lactamasas derivadas de SHV-1 Podbielski y cols. (465) estudiaron una enzima con características bioquímicas y cinéticas compatibles con SHV-2, que confería un nivel superior de resistencia a cefotaxima al observado anteriormente;  $> 128 \mu\text{g/ml}$  frente a  $8\text{--}32 \mu\text{g/ml}$  (251). La secuencia nucleotídica de esta, a la que denominaron SHV-2a, evidenció un solo cambio en el residuo número 10 que no afectaba a las características del enzima. Un estudio posterior de sus promotores mostró diferencias entre ambas (464). La obtención de transformantes que combinaban el promotor de SHV-2a y el gen estructural *bla*<sub>SHV-2</sub> elevó la CMI de cefotaxima desde  $8 \mu\text{g/ml}$  (en el transformante con el promotor de SHV-2 y *bla*<sub>SHV-2</sub>) a  $64 \mu\text{g/ml}$ . Esta demostración establece la posibilidad de recombinaciones entre  $\beta$ -lactamasas y promotores específicos de otras. En este sentido, la única oxacilinas de espectro ampliado descrita, OXA-11 que se diferencia de su predecesora PSE-2 (OXA-10) en tan solo dos aminoácidos (211), presenta un promotor con mayor homología con el de *Pseudomonas putida* que con el de la PSE-2 encontrada en *E. coli*.

Por último, Goussard y cols. (197), mediante la amplificación y secuenciación del gen estructural *bla*<sub>TEM-6</sub> y su promotor, hallaron una región relacionada con la secuencia de inserción IS1 del promotor (P<sub>3</sub>) del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> incluida en el promotor de TEM-6 a la que denominaron "IS1-like". La presencia de esta secuencia de inserción contribuía a elevar la resistencia mediada por TEM-6 y otras  $\beta$ -lactamasas derivadas de TEM. El aumento del nivel de la resistencia por la participación de secuencias de inserción ha sido también evidenciado en las carbapenemasas transferibles encontradas en *B. fragilis* en Francia ya que la resistencia al imipenem solo se manifiesta si están presentes dichas secuencias (466).

#### 4.2.- Aspectos bioquímicos.

Con independencia de los cambios que se producen en el pI, las mutaciones en la secuencia molecular de las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM y SHV modifican la estructura terciaria de la proteína,

alterando el centro activo y las uniones con el antibiótico  $\beta$ -lactámico. Estas modificaciones ocasionan cambios en la afinidad del enzima por el sustrato ( $K_m$ ) y la velocidad o tasa de hidrólisis ( $V_{max}$ ) (548,551). A diferencia de las enzimas plasmídicas clásicas, las BIPEA hidrolizan las cefalosporinas de 3ª generación y los antibióticos monobactámicos con unas tasas relativas de hidrólisis elevadas sólo comparables a las de algunas  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *K. oxytoca* (90,93,155,265). Por el contrario, los valores de afinidad son más bajos en comparación con TEM-1,2 y SHV-1. Bush (89) las ha calificado como "descendientes perezosos" de sus predecesoras ya que presentan una menor actividad enzimática y, en general, una pérdida de afinidad por las amino-, carboxi- y acilureido-penicilinas (251). Como contrapartida, las oxiiimino- $\beta$ -lactamasas poseen una mayor afinidad por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (89). El perfil de inhibición revela unos valores de  $I_{50}$  para el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam inferiores a los obtenidos con TEM-1/2 y SHV-1, siendo el ácido clavulánico el inhibidor más efectivo (94,288).

Las diferencias más acusadas con TEM-1,2 y SHV-1 se establecen a nivel de las cefalosporinas oxiiimino substituidas - cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima - que presentan una tasa de hidrólisis mayor (94,288). En función de este valor y de la eficiencia hidrolítica ( $V_{max}/K_m$ ) las BIPEA se han diferenciado como "cefotaximasas" y "ceftazidimasas" (438). Las primeras hidrolizan preferentemente cefotaxima e incluyen, entre otras TEM-3,4, SHV-2,3,4 y 5. Por el contrario, las ceftazidimasas, fundamentalmente TEM-6,9 y 10, poseen una tasa relativa de hidrólisis y eficiencia hidrolítica más alta para ceftazidima ( $V_{max}=55-70$ ,  $V_{max}/K_m=6,1-55$ ) que para cefotaxima ( $V_{max}=1,6-29$ ,  $V_{max}/K_m=1,8-20$ ). En algunas ocasiones, como es el caso de TEM-12, estas modificaciones son muy bajas con respecto a los valores obtenidos para TEM-1/2 y SHV-1 ( $V_{max}$  para cefotaxima o ceftazidima  $<0,1$ ), produciéndose incrementos de tan solo 5 ó 10 veces en la tasa de hidrólisis ( $V_{max}=0,1-0,7$ ) (438).

Un aspecto relevante de las oxiiimino- $\beta$ -lactamasas es la no inactivación de cefamicinas o carbapenems (94,288), hecho que las individualiza de las cefamicinasas y carbapenemasas. La única carbapenemasa transferible, descrita por Watanabe (595) en *P. aeruginosa*, presenta una mayor afinidad por las cefalosporinas que por las penicilinas. No obstante, los estudios cinéticos demostraron la hidrólisis de penicilinas, de todas las cefalosporinas, incluyendo las oxiiimininocefalosporinas y las metoxi-substituidas, y del imipenem. El aztreonam fue el único  $\beta$ -lactámico estudiado resistente a la acción hidrolítica del enzima. La actividad hidrolítica no fue inhibida por el ácido clavulánico pero sí por EDTA,  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{HgCl}_2$ . En este último caso, la inhibición es reversible con la adición de  $\text{Zn}^{2+}$ , demostrándose que se trataba de una metaloenzima.

Las cefamicinasas, MIR-1, BIL-1, MOX-1 y LAT-1 se caracterizan por conferir resistencia a los metoxi- $\beta$ -lactámicos y conferir un perfil de resistencia similar a las cefalosporinas de clase I (441). Los valores de  $I_{50}$  y  $K_i$  demuestran que BIL-1 posee una alta afinidad por la cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima, rasgo típico de las enzimas de clase I (445). Por el contrario, MIR-1, aún mostrando una alta homología con AmpC de *E. cloacae* (435), tiene una baja afinidad por estas cefalosporinas (441). En el estudio de MIR-1, utilizando un método microbiológico, se demostró la inactivación enzimática de la cefoxitina (435). Por el contrario, en la caracterización bioquímica de BIL-1, al igual que con las cefalosporinasas de clase I, la baja tasa de hidrólisis impidió detectar espectrofotométricamente esta hidrólisis (445). El comportamiento de los inhibidores,  $I_{50}$  para el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, en ambas enzimas es muy similar, diferenciándolas claramente de las oxiiimino- $\beta$ -lactamasas. LAT-1 posee idénticas características que BIL-1, pero a diferencia de ésta se ha constatado, aunque de forma muy lenta, la hidrólisis de cefoxitina (577). El perfil de sustrato de MOX-1 es similar al de AmpC de *P. aeruginosa*, demostrándose en el estudio cinético una alta afinidad por el moxalactam con una eficiencia hidrolítica elevada (236).

Por otra parte, la única oxacilinasas de espectro ampliado descrita, OXA-11, hidroliza penicilinas y nuevas cefalosporinas pero no cefoxitina y carbapenems (211). Esta BIPEA presenta una tasa de hidrólisis más elevadas para las penicilina que para las cefalosporinas y, al igual que su predecesora PSE-2 (OXA-10), hidroliza rápidamente la oxacilina. Aunque la hidrólisis de las cefalosporinas es baja, la afinidad es alta (baja  $K_m$ ) por lo que la eficiencia hidrolítica es elevada, particularmente para la ceftazidima. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas poseen cierta actividad residual que se incrementa con la incubación prolongada de estos sustratos con el enzima.

#### 4.3.- Fenotipos de resistencia.

El descubrimiento de las BIPEA (oxiiimino- $\beta$ -lactamasas) fue posible gracias al análisis de un fenotipo de resistencia inusual dentro de las *Enterobacteriaceae*: resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y la sensibilidad a cefoxitina (280,523). La introducción de los monobactámicos y los carbapenems mostró que estas enzimas conferían también resistencia al aztreonam pero no al imipenem (80,279,534). En la actualidad pueden diferenciarse otros 4 fenotipos asociados a la codificación de BIPEA: el conferido por las cefamicinasas, el de las únicas carbapenemasa y oxacilinasas de espectro ampliado descritas, y por último, el de aquellas enzimas resistentes a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas pero sensibles a oxiiiminocefalosporinas (TABLA 4).

TABLA 4.- Fenotipos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos conferidos por las BIPEA.

Antibiótico	Enterobacteriaceae <sup>a</sup>						<i>P. aeruginosa</i>	
	BIPEA de Clase A						BIPEA de Clase B Carbapenemasa	BIPEA de Clase D Oxacilinas
	TEM derivada	SHV derivada	Enzimas IRT	relacionadas con <i>K. oxytoca</i>	<i>P. vulgaris</i>	BIPEA de Clase C Cefamicinas		
Ampicilina	512-1024 <sup>b</sup>	>1024	128->1024	R	>400	64->1024	---	---
Carbenicilina	>1024	>1024	---	---	>400	128-256	>400	512
Ticarcilina	>1024	>1024	8-1024	---	---	---	---	---
Piperacilina	64-256	512	1-512	R	---	64->256	25	32
Temocilina	4-8	4-16	---	---	---	8-64	---	---
Amox/clav	4-8	8-16	32-64	S	---	128->256	---	---
Cefazolina	4-64	64-128	2	---	>400	>512	---	---
Cefamandol	2-32	16-64	1	---	>400	---	---	---
Cefuroxima	4-64	16-128	2-4	64-256	>400	32->256	---	---
Cefotaxima	0,1-32	0,5-128	0,03-0,06	1-64	100-200	2-128	---	64
Ceftioxima	0,1-16	0,5-64	---	---	0,78-1,56	16->512	---	---
Ceftriaxona	0,1-32	0,2-64	0,01-0,03	---	>400	64-128	---	128
Cefpiroma	0,1-2	0,1-16	---	---	---	1-2	---	128
Ceftazidima	2-512	32-128	0,1-0,5	0,5-256	3,13-12,5	4->256	>400	512
Aztreonam	0,2-128	4-256	0,03-0,1	32-64	25	1-128	25	32
Cefoxitina	2-4	2-8	1-4	4	1,56	64->256	---	---
Cefotetan	0,1-0,5	0,1-1	---	---	---	64-256	---	---
Moxalactam	0,1-0,5	0,2-1	0,03-0,2	1	0,39	2->512	>400	128
Imipenem	0,06-1	0,2-1	0,03-0,06	0,5-1	0,78	0,2-2	50	1
Meropenem	0,01-0,06	0,01-0,06	---	---	---	0,06-0,1	100	8

<sup>a</sup>: *E. coli* y *K. pneumoniae*; <sup>b</sup>:  $\mu\text{g/ml}$ .

Las  $\beta$ -lactamasas derivadas por mutación de TEM-1,2 y SHV-1 confieren resistencia a amino-, carboxi- y acilureidopenicilinas con un nivel similar al que se genera con sus predecesoras. Asimismo, se caracterizan por la resistencia que determinan a las cefalosporinas de 1ª generación, 2ª, excepto la cefoxitina, y 3ª, excepto el moxalactam (251,254). Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas sinergizan con las penicilinas y cefalosporinas, disminuyendo el valor de la CMI a concentraciones consideradas como sensibles (398,399). Por otra parte, la sensibilidad a metoxi-penicilinas (temocilina) y a carbapenems (imipenem y meropenem) permanece inalterada (251) (TABLA 4).

Este fenotipo "general" de las oxiiimino- $\beta$ -lactamasas puede sufrir algunas modificaciones que dependen fundamentalmente de: 1) diferente nivel de expresión producido por una misma enzima en una especie determinada, 2) diferente nivel de expresión en las distintas especies de *Enterobacteriaceae*, 3) coexistencia con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas que "enmascaran" este patrón de resistencia y 4) coexistencia con otros mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, fundamentalmente relacionados con la permeabilidad, que alteren la uniformidad del fenotipo de resistencia.

Es posible realizar una diferenciación fenotípica entre las BIPEA de tipo TEM y las derivadas de SHV-1 utilizando un amplio rango de concentraciones con las aminopenicilinas, ya que, en general, las derivadas de TEM presentan una CMI inferior a la ampicilina que las derivadas de SHV (1.000-4.000  $\mu\text{g/ml}$  frente a 500-16.000  $\mu\text{g/ml}$ ) (251). Similar apreciación, aunque con diferente nivel de CMI, es válida para las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación y cefalosporinas orales - cefixima, ceftibuten y cefdinir - (0,25-32  $\mu\text{g/ml}$  frente a 1-256  $\mu\text{g/ml}$ ) (37,38,251,278). Con respecto a las cefalosporinas de 3ª generación pueden reflejarse distintos niveles de resistencia con una misma enzima (167,252,291,406) que en algunas ocasiones ofrecen valores de CMI inferiores a 1-2  $\mu\text{g/ml}$  (TABLA 2), o halos de inhibición con discos con carga estándar (30  $\mu\text{g}$ ) de 23-30 mm, valores que entran dentro de la categoría de lo "sensible" establecido por algunos organismos internacionales (398,399).

En general, los valores de CMI para la cefotaxima en las cepas que codifican enzimas TEM derivadas oscilan entre 0,06 y 8  $\mu\text{g/ml}$ , excepto TEM-3 y TEM-4 que confieren un nivel más alto (32  $\mu\text{g/ml}$ ) (TABLA 2). Para la ceftazidima y el aztreonam son más elevados, observándose un amplio rango, 0,2-256  $\mu\text{g/ml}$  (TABLAS 2 y 4). Por otra parte, de las cinco enzimas derivadas de SHV-1 identificadas, todas, excepto SHV-6, ofrecen un fenotipo homogéneo, obteniéndose valores superiores a 16  $\mu\text{g/ml}$  para cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (TABLA 2). Las discrepancias entre los valores de CMI de la cefotaxima y los de la ceftazidima y el aztreonam en las diferentes enzimas podrían ser útiles en la diferenciación fenotípica de estas  $\beta$ -lactamasas (252).

Las BIPEA con resistencia a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas derivadas de TEM-1 se caracterizan por la ausencia de sinergia entre el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam con las penicilinas (48,66,569,584). En este sentido las CMI de la asociación amoxicilina/ácido clavulánico (32/16-64/32  $\mu\text{g/ml}$ ) son más elevadas que las encontradas para TEM-1 (4/2-8/4  $\mu\text{g/ml}$ ) y sólo comparables a la que se generan con la hiperproducción de ésta enzima (16/8-64/32  $\mu\text{g/ml}$ ) (254,339). Por el contrario, los valores de CMI de la ticarcilina (8-1024  $\mu\text{g/ml}$ ) y piperacilina (1-512  $\mu\text{g/ml}$ ) son inferiores a los encontrados para TEM-1 ( $> 1024$  y  $256-> 1024$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente). Asimismo, las CMI de la cefazolina (2  $\mu\text{g/ml}$ ) son inferiores a las que se generan con la hiperproducción de TEM-1 ( $> 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) (432). Estas últimas apreciaciones son menos patentes con la cefotaxima y la ceftazidima que a lo sumo reducen una dilución el valor de la CMI para las BIPEA resistentes a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (66,584).

Con el grupo de las oximiinocefalosporinasas no existen datos de sensibilidad completos para todas las enzimas descritas. Tanto las relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *P. vulgaris* como las que tienen cierta homología con las  $\beta$ -lactamasas de *K. oxytoca* presentan resistencia a penicilinas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, excepto cefoxitina. Estas enzimas, son inhibidas por el ácido clavulánico y no confieren resistencia a los carbapenems (60,355,596,613). La inducción de la cefuroximasas clásica de *P. vulgaris* eleva fundamentalmente las CMI de cefotaxima con una menor afectación de la ceftazidima y el aztreonam (307,502). Este patrón se reproduce con las enzimas FEC-1 y FPM-1,  $\beta$ -lactamasas relacionadas con las cromosómicas de *P. vulgaris* (355,596). Por el contrario, la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa K1, enzima cromosómica de *K. oxytoca*, afecta en mayor grado al aztreonam (478,502), característica que se identifica en las BIPEA relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas de *K. oxytoca* - MEN-1 y KH - (60,613).

La descripción de *Enterobacteriaceae* con un fenotipo transferible que se caracterizaba por la resistencia simultánea a cefalosporinas de 3ª generación y cefoxitina con sensibilidad a los carbapenems hizo sospechar que había surgido un nuevo tipo de BIPEA (40). Denominadas cefamicinasas por la resistencia que confieren a las cefamicinas, su nombre correcto debería ser metoxi-betalactamasas ya que, con la excepción de CMY-2 y FOX-1 (45,192), la resistencia es cruzada con los oxacefems (moxalactam) y las 6-metoxi-penicilinas (temocilina) (40,45,236,435,445,577). El comportamiento de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas frente a estas enzimas no es uniforme y sólo se observa una reducción discreta de la CMI de cefoxitina al asociar ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam en las cepas productoras de las enzimas CMY-1 y CMY-2 (40,45). Asimismo, el compuesto BRL-42715B, potente inhibidor de  $\beta$ -lactamasas tanto plasmídicas clásicas como cromosómicas de clase I, ha demostrado actividad inhibidora en aquellas cefamicinasas ensayadas, CMY-1,2 y FOX-1 (46,190).

El fenotipo de resistencia que confieren las cefamicinas es muy cercano al que determinan las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase Ia (*Enterobacter* y *Citrobacter*) y Id (*P. aeruginosa*) de las que derivan, mimetizando a estas en su estado desreprimido (307,441,502). La cefpiroma y la cefepima son las oximiinocefalosporinas con mayor actividad intrínseca, reproduciéndose el fenómeno que se observa con las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase I en su estado desreprimido. Como dato diferenciador, con las cefamicinas se alcanza un nivel más elevado de resistencia a la cefoxitina y las amino-, carboxi- y acilureido-penicilinas.

Por el momento no existen datos clínicos sobre la incorporación del gen *ampC* de *E. coli* en plásmidos, si bien tal posibilidad entra dentro de lo probable. Jacoby y Carreras (251) estudiaron la expresión de este gen integrado en un plásmido, evidenciando un fenotipo muy similar al conferido por la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *E. coli*: resistencia a la ampicilina, amoxicilina/clavulánico, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, incluyendo las cefamicinas. La ceftazidima fue la cefalosporina de 3ª generación más afectada y en menor grado cefotaxima y ceftriaxona, siendo la cefpiroma y la cefepima las que menos elevaron su CMI.

Un escalón más en el grado de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue el hallazgo en Japón de la carbapenemasa transferible de *P. aeruginosa* (595). Su perfil hidrolítico determina resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasa. Únicamente el aztreonam escapa a la acción hidrolítica del enzima, obteniéndose unos valores de CMI categorizados como "sensibles" (25  $\mu\text{g/ml}$  en la cepa original y 3,13  $\mu\text{g/ml}$  en los transconjugantes). A diferencia de esta, la oxacilinasas de amplio espectro - OXA-11 -, identificada también en *P. aeruginosa*, es sensible al imipenem y el meropenem (211). El alto grado de afinidad de la OXA-11 por la ceftazidima confiere una elevada disminución de la sensibilidad a este antibiótico (512  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con la cefotaxima (64  $\mu\text{g/ml}$ ) (TABLA 4).

#### 4.4.- Influencia de la permeabilidad.

La detección fenotípica de microorganismos con  $\beta$ PEA se ha visto, en ocasiones, favorecida por la presencia de estas enzimas en cepas con alteraciones en la membrana externa (205,433,599). Con ello se incrementan los valores intermedios de CMI de algunas cefalosporinas que, con relativa asiduidad, se manifiestan en estas cepas (259,451). Asimismo, se minimiza el efecto de su relativa baja actividad enzimática y la pérdida de afinidad por algunos de los sustratos (89).

Los defectos de permeabilidad en la cepas con  $\beta$ PEA ha sido documentado en alguna ocasión (89), particularmente en *K. pneumoniae* (18,237,433,582,599). Pangón y cols.(433) demostraron

que la disminución cuantitativa de dos porinas fundamentales (40 y 41 kDa) en una cepa de *K. pneumoniae* con una BIPEA, TEM-3, elevaba los valores de CMI de la ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, aztreonam (de 2-8 a 16-32  $\mu\text{g/ml}$ ), cefoxitina (de 4 a 32  $\mu\text{g/ml}$ ) y la actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Este trabajo posee una doble importancia; la documentación de alteraciones en la membrana externa en una cepa productora de BIPEA y la constatación de la selección "in vivo" de estos mutantes ya que esta cepa de *K. pneumoniae* se obtuvo tras el tratamiento con cefoxitina y gentamicina de un paciente con una neumonía por *K. pneumoniae* productora de TEM-3. Asimismo, se ha determinado que la ausencia de estas dos porinas o el cambio de sus propiedades fisicoquímicas afecta también a la expresión de la enzima SHV-5, confirmando en este caso la disminución de la efectividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (205,582).

Por otra parte, se han documentado alteraciones más acusadas de la permeabilidad en una cepa de *E. coli* con una BIPEA de pl 5,25 - TEM-12 - (599). Esta cepa presentaba una ausencia total de OmpF y reducción del número de porinas de 39 (OmpC) y 37 kDa. La actividad de ceftazidima disminuyó drásticamente, elevándose la CMI desde 0,2 a 37  $\mu\text{g/ml}$ . También se redujo el efecto de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa.

Estudios "in vitro" con introducción de diferentes plásmidos que codifican BIPEA en cepas isogénicas de *E. coli* con alteraciones en las porinas OmpF y OmpC demostraron estos hallazgos (73,99,251) y confirmaron que no sólo afectaba a la expresión de la mayoría de las BIPEA derivadas de TEM-1, 2 y SHV-1, sino también a otras  $\beta$ -lactamasas como MIR-1 (73). Por otra parte, se observó que un solo cambio en una porina determinada no condiciona modificaciones uniformes para todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Asimismo, se constató que los cambios de comportamiento están en relación con la BIPEA estudiada y que la ceftazidima era uno de los  $\beta$ -lactámicos más afectados, mientras que la cefpiroma y la cefepima conservaban mayor actividad intrínseca (73,99,251).

La adquisición de un mecanismo de resistencia secundario debido a alteraciones en la permeabilidad en cepas productoras de BIPEA parece un hecho probado (433). Recientemente en un trabajo multicéntrico realizado en Francia (538) se ha observado un incremento notable de la resistencia a la cefoxitina en *Enterobacteriaceae*, particularmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, por lo que el proceso inverso, adquisición de BIPEA en cepas con modificaciones en sus porinas, es un hecho probable.



## 5.- IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

La detección de las cepas productoras de  $\beta$ lPEA está, en ocasiones, dificultada por el bajo nivel de resistencia que confieren estas enzimas, determinando una categorización errónea de los datos de sensibilidad cuando se aplican criterios de organismos internacionales comunmente aceptados (398,399,400). Por otra parte, la baja actividad enzimática, el tipo de microorganismo que las alberga y la posibilidad de que éste produzca otra u otras  $\beta$ -lactamasas puede comprometer aún más su identificación y posterior caracterización.

En una primera aproximación el patrón o **fenotipo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos** será quien establezca la posible presencia de  $\beta$ lPEA (TABLA 4). Este fenotipo deberá incluir los datos de sensibilidad a las cefalosporinas de 3ª generación, monobactámicos y los carbapenems y podrá determinarse bien utilizando los diámetros de los halos de inhibición, en la técnica de **difusión por disco** (398), o bien los valores de la CMI (técnica de **dilución en agar y microdilución**) (399). En algunas ocasiones, la producción enzimática o expresión de la  $\beta$ -lactamasa es baja y el nivel de resistencia que se alcanza no es elevado de tal forma que los valores de CMI o halos de inhibición se encuentran en la categoría de lo "sensible" establecido por diferentes organismos internacionales (398,399,400). Esta circunstancia puede minimizarse estudiando simultáneamente la sensibilidad a las distintas cefalosporinas de 3ª generación y al aztreonam (259,453) o elevando el inóculo bacteriano (482). No obstante, es necesario que los sistemas utilizados para el estudio de la sensibilidad, y en concreto los que determinan la CMI, tengan un amplio rango de concentraciones de tal forma que puedan detectar pequeñas elevaciones en los valores de la CMI (168). En este sentido algunos **sistemas automáticos comerciales** utilizan paneles con unas concentraciones que escapan a esta consideración, habiéndose constatado, dependiendo de las concentraciones empleadas, fallos en la identificación de las cepas con  $\beta$ lPEA (168,172,428).

El estudio con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas es útil para la detección de éstas enzimas, en particular las derivadas de TEM-1,2 y SHV-1. La sinergia entre las cefalosporinas de 3ª generación y monobactámicos con el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam facilita su identificación presuntiva. Jarlier y cols. (259) describieron en 1988 una técnica sencilla, denominada de **doble difusión con discos**, basada en esta propiedad. Este método consiste en la realización de un antibiograma convencional situando un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu$ g) a una distancia de 30 mm de discos con carga standard (30  $\mu$ g) de cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam. La ampliación del halo de inhibición de estos últimos en las proximidades del disco de amoxicilina/ácido clavulánico indica la presencia de una  $\beta$ lPEA. Este método tiene algunas

limitaciones ya que enzimas de codificación cromosómicas como son la cefuroximas de *P. vulgaris* y la enzima K1 de *K. oxytoca*, la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Klebsiella spp.* y de la plásmídica SHV-1 producen sinergia entre alguno de los discos de las cefalosporinas o el aztreonam y el ácido clavulánico. Asimismo, no todas las  $\beta$ lPEA descritas son inhibidas por el ácido clavulánico (252) y en las cepas de *Enterobacteriaceae* con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase Ia, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Serratia*, la presencia de las  $\beta$ lPEA puede quedar enmascarada por la desrepresión enzimática de aquellas (observaciones personales).

Al igual que lo acontecido con el análisis del fenotipo de resistencia, la utilización de las cefalosporinas de 3ª generación, el aztreonam y los carbapenems en la determinación del **perfil de sustrato y parámetros cinéticos** ( $V_{max}$ ,  $K_m$  y eficiencia hidrolítica) facilitan la identificación de las  $\beta$ lPEA. Los extractos bacterianos necesarios para su realización se obtienen generalmente por sonicación (96) y es condición imprescindible la presencia de una única enzima. La determinación de los parámetros cinéticos puede estar limitada por la lenta reacción de alguna de estas  $\beta$ lPEA con el nitrocefín (115), pudiendo substituirse por la cefaloridina o la bencilpenicilina. Junto a estos valores, es recomendable establecer el **perfil de inhibición** frente a inhibidores suicidas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y compuestos quelantes como el EDTA (96). Asimismo, la **inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín** y la aplicación de los algoritmos propuestos por Papanicolaou y Medeiros (434) permiten diferenciar las  $\beta$ lPEA de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase I y las plasmídicas de amplio espectro.

Existen algunas técnicas microbiológicas que además de detectar la presencia de  $\beta$ -lactamasa pueden utilizarse de forma semicuantitativa para conocer el perfil de sustrato siempre que el extracto contenga una sola enzima, por lo que han sido propuestas y aplicadas para el ensayo de las  $\beta$ lPEA. La primera de ellas, fue descrita por Masuda en 1976 (353) y utilizada por Papanicolaou y cols. para el estudio de la cefamicinasa MIR-1 (435). Con esta técnica se observa la destrucción del antibiótico  $\beta$ -lactámico por medio de discos cargados con diferentes diluciones del extracto bacteriano que contiene el enzima y su influencia en la sensibilidad de un microorganismo testigo, generalmente *Micrococcus luteus*. McGhie (361) modificó esta técnica, empleando un cultivo en fase logarítmica en vez del extracto enzimático, aunque no se ha aplicado al estudio de las  $\beta$ lPEA.

El método descrito por van de Klundert y cols. (580) tiene un fundamento similar a las dos anteriores, inactivación de un sustrato y observación con un microorganismo testigo. Ha sido utilizado con éxito para las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y podría ser de utilidad en el ensayo de las  $\beta$ lPEA. Este método incorpora un extracto enzimático en el agar y utiliza *Bacillus subtilis* como

testigo de la inactivación enzimática. Sobre el agar se depositan discos de antibiótico, cuantificando la inactivación por la disminución de los halos de inhibición.

Recientemente, Mackenzie y Ferris (329) han desarrollado un sistema de cribado para detectar cepas de *K. pneumoniae* productoras de  $\beta$ IPEA. Esta técnica se realiza utilizando diluciones seriadas de antibiótico (ceftazidima) en agar Mueller-Hinton con un sustrato de metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido (0,07 mg/ml). El crecimiento de una cepa de *E. coli* sobre estas placas produce la hidrólisis del sustrato provocando fluorescencia cuando se ilumina con luz ultravioleta. Por el contrario el desarrollo de una cepa de *K. pneumoniae* no genera fluorescencia al no hidrolizarse el sustrato. La inoculación simultánea de las placas en superficie con una cepa de *E. coli* y en botón con diferentes cepas de *K. pneumoniae* determina que por debajo de la CMI de la cepa de *E. coli* no se inhiba la inducción de la fluorescencia. Sin embargo, cuando una cepa de *K. pneumoniae* produce una  $\beta$ IPEA facilita el satelitismo de la cepa de *E. coli* a su alrededor. Esta, hidrolizará el sustrato y producirá un anillo de fluorescencia entorno al botón de depósito.

Thomson y cols. (572) comunican en 1984 la utilidad del método de "sensibilidad en tres dimensiones" para el estudio de la inactivación enzimática de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Con posterioridad Thomson y Sanders (573) modificaron y aplicaron esta técnica a la detección y ensayo de las  $\beta$ IPEA (oxiimino- $\beta$ -lactamasas y cefamicinasas). Básicamente, el método es una modificación de la difusión por disco (398) y utiliza un inóculo bacteriano ( $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml) que se deposita en una hendidura realizada en el agar a 3 mm de donde se depositan los discos de antibiótico. La superficie del agar se inocula previamente con un inóculo estándar del mismo microorganismo (método directo) o con un microorganismo testigo, *E. coli* ATCC 25922 (método indirecto). Con este sistema se consigue una información simultánea de la sensibilidad antibiótica y del perfil de sustrato, facilitando la identificación de  $\beta$ -lactamasas y en concreto de las de espectro ampliado.

Desde que Matthew y cols. (358) introdujeran en 1975 la técnica del isoelectroenfoco en el ensayo de las  $\beta$ -lactamasas han sido descritas y diferenciadas un gran número de enzimas (90,91). La coincidencia de pI de varias enzimas ha limitado su uso para individualizar las  $\beta$ IPEA. En unión con otros parámetros o datos de sensibilidad es útil para la caracterización de estas enzimas. Algunas modificaciones sencillas de esta técnica renuevan su utilidad: la visualización de las  $\beta$ -lactamasas aplicando una solución de nitroceftin con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, cefoxitina o una cefalosporina de 3ª generación (88,435,510) pueden facilitar la identificación de estas enzimas. Otra modificación establecida por Bauerfeind y cols. (41) consiste en, una vez realizado el enfoque, depositar sobre el gel de isoelectroenfoco una capa fina de agar Mueller-Hinton con cefotaxima (1  $\mu$ g/ml). Tras dos horas de incubación a 35 °C se inocula la superficie del agar con un cultivo de *E. coli* ATCC

25922 (CMI de cefotaxima 0,06-0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) e incubó nuevamente a 35 °C durante 18 h. Si el enzima hidroliza la cefotaxima se producirá crecimiento exclusivamente sobre la banda que contiene la BIPEA. Esta técnica permite además identificar qué enzima es responsable de la hidrólisis en un extracto que posea más de una  $\beta$ -lactamasa (574).

Una modificación del isoelectroenfoque es la realización de las denominadas "curvas de titulación" (586), que se fundamentan en la obtención de curvas sigmoidales diferenciadas al desarrollar la electroforesis perpendicularmente al gradiente de pH. Su utilización puede ser resolutive en la separación de enzimas con igual pI, circunstancia posible tanto entre las BIPEA como entre éstas y las de amplio espectro (252,495). Asimismo, se ha empleado la **electrodialisis** a partir de los geles de isoelectroenfoque para separar BIPEA de otras enzimas con pI cercanos (444).

La **separación rápida de proteínas por cromatografía líquida (FPLC)** (440) es otra técnica de diferenciación utilizada en el estudio de las BIPEA, que permitió la identificación y separación de la BIPEA DJP-1 de pI 7,9 de otras dos enzimas presentes en la misma cepa de *K. pneumoniae*.

La aplicación de la tecnología genética y en concreto la utilización de las **sondas de ADN** y el **oligotipado** ha supuesto un avance importante en la identificación y caracterización de las BIPEA. Mabilat y Courvalin (322) utilizaron la hibridación en colonia con oligonucleótidos de tan solo 17 nucleótidos con 265 aislamientos de *Enterobacteriaceae* que presentaban sinergia entre los inhibidores de BIPEA y las cefalosporinas de 3ª generación. Con este estudio lograron identificar 7 nuevas BIPEA (TEM-13,14,15,16,17,18, y 19) e individualizar estas y otras BIPEA en cepas que presentaban más de una enzima.

Por otra parte, las técnicas de biología molecular han permitido establecer relaciones filogenéticas entre las BIPEA y sus ancestros, particularmente en las resultantes de la integración de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas en plásmidos (cefamicinasas y BIPEA relacionadas con enzimas cromosómicas de *P. vulgaris* y *K. oxytoca*). Asimismo, el uso de esta tecnología ha facilitado la caracterización de las diferentes clases de BIPEA (211) y la realización de estudios epidemiológicos amplios (242,324).

## 6.- EPIDEMIOLOGIA DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

Las primeras cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con  $\beta$ lPEA (oxiimino- $\beta$ -lactamasas) se describieron en Alemania en 1983 por Shah y Stille (523). Ese mismo año y también en Alemania, Knothe y cols. (280) documentan la transferencia de la resistencia plasmídica a cefotaxima en *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. En 1985, Kliebe y cols. (279) caracterizan en una cepa de *Klebsiella ozaenae* del mismo origen que las anteriores, una nueva  $\beta$ -lactamasas a la que denominaron SHV-2 por su relación con la enzima SHV-1. Breve tiempo después y de manera casi simultánea, se describen en Francia dos brotes epidémicos causados por *Enterobacteriaceae*, fundamentalmente *K. pneumoniae*, con elevado nivel de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación. En estas cepas se caracterizó una nueva  $\beta$ -lactamasas plasmídica a la que se denominó inicialmente CTX-1 y con posterioridad TEM-3 por derivar por mutación de TEM-2 (80,536).

Estudios retrospectivos han demostrado la existencia de estas enzimas en cepas clínicas con anterioridad a 1983. Payne y cols. (443,444) caracterizaron en una cepa de *K. oxytoca* aislada en febrero de 1982 una  $\beta$ lPEA de pl 5,3 a la que denominaron TEM-E2. Asimismo, Casellas y Goldberg (105) estudiaron una cepa de *K. pneumoniae*, liofilizada en 1982, y demostraron en ella la presencia de una  $\beta$ lPEA con un fenotipo similar a SHV-2.

En España, las primeras cepas con  $\beta$ lPEA se encontraron en 1988 en nuestro Hospital (28), aislándose de forma casi simultánea en otros hospitales de la Comunidad Autónoma de Madrid (167) y en la provincia de Barcelona (495,496). El estudio retrospectivo de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* de nuestro Hospital desde el año 1977 demostró la existencia de un número limitado de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* con este fenotipo en el año 1982 (340), confirmandose la afirmación realizada por Jacoby y Medeiros (252): "se encuentran cuando se buscan".

La resistencia transferible a la cefoxitina y por lo tanto la descripción de las cefamicinasas fue documentada por vez primera por Bauerfeind y cols. (40) en 1989 en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Corea del Sur. Sin embargo, Knothe y cols. (280) en una de las primeras comunicaciones de  $\beta$ lPEA observaron la resistencia transferible a cefoxitina en una cepa de *S. marcescens* aunque no presentaron datos en relación con el plásmido, la naturaleza del enzima o el perfil de sensibilidad. Con posterioridad Papanicolaou y cols. (435) comunicaron una epidemia intrahospitalaria acaecida entre septiembre de 1988 y junio de 1989 por *K. pneumoniae* con una  $\beta$ lPEA (MIR-1) que hidroliza cefoxitina. El análisis retrospectivo de los aislamientos de este hospital

y su estudio posterior confirmó la presencia de una enzima similar en un aislamiento de *K. pneumoniae* del año 1981 (Medeiros, comunicación personal).

Otras BIPEA, carbapenemasas y oxacilinasas de amplio espectro, se describieron, respectivamente, en 1988 y 1991 (211,595). Por otra parte, la resistencia a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas debida a  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM fue detectada por vez primera en Francia en 1991 (48) y con posterioridad en Escocia (569). En España la primera cepa con estas características se aisló en enero de 1992 en un paciente con una infección urinaria tratado con amoxicilina/ácido clavulánico (66).

### 6.1. Distribución y prevalencia.

Las oximiino- $\beta$ -lactamasas se han encontrado en los 5 continentes. Su prevalencia en los distintos países es muy variable con diferencias importantes incluso de un hospital a otro dentro de una misma área. Muchas de las BIPEA identificadas apenas elevan la CMI de las cefalosporinas de 3ª generación por lo que en el estudio rutinario en el laboratorio pueden pasar desapercibidas (259,451). Por este motivo, la incidencia real de enterobacterias con BIPEA es desconocida y pueden estar infravaloradas. Asimismo, existen pocos estudios multicéntricos tendentes a aclarar esta incógnita.

*K. pneumoniae* es la enterobacteria en donde se han caracterizado más BIPEA, sin que hasta el momento exista una explicación convincente para tal circunstancia (270). Con frecuencia, su hallazgo esta unido a epidemias nosocomiales (252,508). En estudios recientes realizados en Francia (538), Inglaterra (304) y Portugal (169) la incidencia de cepas de *K. pneumoniae* con BIPEA se situaba entre el 14 y el 16 %. Además, se han aislado estas enzimas en otros géneros o especies: *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *Salmonella spp.*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *L. malonatica*, *M. morgani*, *P. stuartii* (252,451,508) y más recientemente en *P. mirabilis* (63,157,158,489,596). El bajo número de BIPEA encontradas en esta última especie parece estar limitado por su baja frecuencia de conjugación en comparación con otros microorganismos (336).

Francia es el país que con mayor atención ha estudiado la incidencia de las BIPEA. En un trabajo multicéntrico de 16 hospitales, se observó que durante 1985 la frecuencia de *K. pneumoniae* productoras de estas enzimas era de un 0,7%, 8,4% en 1987 y 11,0% en 1988 (568). Un estudio posterior en 12 hospitales, reveló que este porcentaje se había incrementado; 14,3% en 1989 y 14,1% en 1990 (538). Mientras que en determinados centros de este estudio no se aislaron cepas con BIPEA, en otros la incidencia fue del 47,6%, demostrándose las diferencias existentes de un centro hospitalario a otro dentro de un mismo país. Un trabajo más reciente realizado en 26 hospitales

estimó su incidencia en 1991 en un 9,6%, siendo TEM-3, TEM-21 y SHV-4 las enzimas caracterizadas (186).

En el resto de Europa se han identificado cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de oximinó- $\beta$ -lactamasas en el Reino Unido (115,149,264,326,438,439,444,526,552), Alemania (42,44,279, 280,486,523), Bélgica (438,442,590), Portugal (169,550), Suecia (257), Suiza (508), Grecia (252,253,582) e Italia (431). En España son pocos los estudios realizados, si bien se han caracterizado tanto  $\beta$ -lactamasas derivadas de TEM como de tipo SHV (3,106,165,167,341,495,496). Asimismo, las  $\beta$ lactamasas se han identificado en: Australia (385), Singapur (385), China (253), India (394,440), Canadá (592), Estados Unidos (18,252,401,471,508), Argentina (105,252,489), Chile (205,253), Israel (174), Turquía (202), Túnez (53,451), Egipto (508,526), Sudafrica (114) y Senegal (483). Es de resaltar que, en este último país, en un solo centro hospitalario un 74,4% de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* eran portadores de  $\beta$ lactamasas. La mayor variedad de  $\beta$ lactamasas se ha encontrado en Francia (TABLA 2). Fuera de este país, SHV-2 es el enzima más identificado (508), habiéndose caracterizado en al menos 13 países. SHV-5 se ha encontrado en 8 países, TEM-6 en 4 y TEM-10 en 3 (3,252,508). La distribución de todas estas enzimas no es homogénea ya que mientras en Europa se han encontrado  $\beta$ lactamasas de tipo TEM y SHV, en Norteamérica, con la excepción de SHV-2,4 y 5, predominan las derivadas de TEM y en Sudamérica, casi exclusivamente, las de tipo SHV (252,508).

Aunque es difícil establecer una relación puntual entre el tratamiento antibiótico específico y la aparición de estas enzimas, el estudio de los diferentes brotes y epidemias ha asociado el aislamiento de cepas con  $\beta$ lactamasas con el consumo de cefalosporinas de 3ª generación y/o aminoglicósidos (80). Existen ejemplos claros; la utilización empírica de ceftazidima en monoterapia en pacientes febriles neutropénicos determinó la selección y diseminación epidémica de una cepa de *K. pneumoniae* resistente a la ceftazidima en la que se caracterizó una nueva enzima (TEM-26) (401). La sustitución posterior de este antibiótico en los tratamientos limitó su diseminación. Similar experiencia, restricción del uso de cefalosporinas de 3ª generación y desaparición de los respectivos brotes epidémicos, se produjo con las  $\beta$ lactamasas TEM-10 y TEM-12 (YOU-2) (374,481,578). Otros ejemplos son, sin embargo, contradictorios, ya que se demostró una mayor asociación de aparición de estas cepas en enfermos que habían recibido cotrimoxazol o quinolonas que en los que habían recibido cefalosporinas de 3ª generación en comparación con enfermos de grupos controles que habían recibido similar tratamiento (126). Por otra parte, el fracaso en el control de una epidemia por tratamiento con cefalosporinas de 3ª generación determinó la aparición de nuevas variantes de  $\beta$ lactamasas en la misma unidad (532) e incluso en el mismo paciente (129), coexistiendo con las enzimas previamente caracterizadas.

Con independencia de la utilización de antibióticos, los pacientes en los que se han aislado estas cepas están generalmente ingresados en unidades de cuidados intensivos, con estancias medias relativamente largas, sometidos a ventilación mecánica, con catéteres arteriales o sondas urinarias y en ocasiones previamente colonizados a nivel intestinal por microorganismos productores de estas enzimas (80,127,126). Por otra parte, existen también aislamientos de cepas productoras de BIPEA en pacientes ingresados en instituciones benéficas o clínicas de acogida y en pacientes seguidos en régimen ambulatorio (167,473).

Por el momento, existen pocos datos epidemiológicos con el resto de las BIPEA - cefamicinasas, carbapenemasas y oxacilinasas - que permitan establecer la incidencia de estas enzimas: se han aislado en casos muy concretos y sólo en determinados países (252,508). Merece una mención especial la cefamicinasa MIR-1, caracterizada en una epidemia que afectó a 11 pacientes (435), y más recientemente las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas relacionadas con enzimas de tipo TEM que muestran resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cuya prevalencia se desconoce y que por los escasos datos referentes a ellas (49,66,584,569) podrían ser relativamente frecuentes en algunos países como Francia (79,535).

El control en la prescripción de las cefalosporinas de 3ª generación (401,481,578), el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos no hidrolizados por las BIPEA (124,433) o  $\beta$ -lactámicos en asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (160), el empleo de quinolonas (Casellas, comunicación personal), la decontaminación intestinal selectiva (81), y el aislamiento de los pacientes (326) han sido algunas de las estrategias ensayadas para el control de las distintas epidemias. La combinación de estas medidas, pero sobre todo el cambio en la política de antibióticos y un buen seguimiento microbiológico determinan una mayor probabilidad de éxito en el control de la diseminación de las BIPEA (124,127,257).

## **6.2.- Repercusión clínica.**

Los " $\beta$ -lactámicos de 3ª generación", introducidos en los inicios de la década de los 80 suscitaron una gran expectación y una falsa seguridad ante lo que podría ser la solución del problema generado por la amplia diseminación de las  $\beta$ -lactamasas clásicas. Sin embargo, ante el asombro de clínicos y microbiólogos, surgieron las primeras publicaciones que hacían referencia a la capacidad hidrolítica de las BIPEA y al fracaso terapéutico subsiguiente a su utilización en diversos tipos de infecciones (80,280,523 536). A la alarma suscitada por lo que podía ser un hecho de marcada trascendencia terapéutica, se abrió un período en el que el cúmulo de datos y el tiempo transcurrido permitió relativizar su repercusión clínica y analizar el problema con una perspectiva algo diferente (438).



La significación clínica de las BIPEA puede ser muy variable y depende fundamentalmente de la epidemiología y patogenicidad del microorganismo, del plásmido que la alberga y su trasferibilidad, de la resistencia asociada a la producción del enzima, del estado clínico del propio paciente y del tipo de infección. Aunque existen brotes y epidemias bien documentadas por microorganismos productores de BIPEA, la mayoría de estas enzimas se han aislado de forma esporádica (252,508). Por ello, si se considera el total de aislamientos de un hospital su incidencia global es generalmente baja. Independientemente de ello, su importancia clínica radica fundamentalmente en la gran limitación terapéutica que condiciona su espectro hidrolítico (252), sobre todo en aquellas infecciones en las que los antibióticos hidrolizados por estas enzimas se consideran fármacos de primera elección.

Teniendo en cuenta todas las BIPEA identificadas se puede establecer cuatro situaciones diferentes con implicaciones clínicas distintas: a) BIPEA de distribución universal, b) asociadas a aislamientos epidémicos, c) en brotes limitados y d) aislamientos esporádicos. Las distintas enzimas encuadradas en cualquiera de los grupos establecidos pueden en un futuro verse desplazadas a otros. En este sentido, algunas de las BIPEA, como SHV-5 y TEM-10, fueron primeramente detectadas en casos puntuales (205,472) y en la actualidad se han descrito brotes o epidemias más importantes incluso en áreas muy alejadas del lugar inicial de identificación (44,374,473).

El primer grupo, BIPEA de distribución universal, posee a nuestro juicio una única representante, SHV-2, de singulares características desde un punto de vista epidemiológico (453). Es una enzima con difusión universal identificada en al menos 14 países (165,508). Su hallazgo es más común en el género *Klebsiella* y en menor medida en *E. coli* (453), en general, en brotes epidémicos localizados o en pacientes concretos de forma esporádica, tanto ingresados como procedentes de la comunidad (165). Asimismo, se han detectado epidemias amplias por diferentes especies: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *Salmonella wien* y *Salmonella typhimurium* (165,214,486).

Muy distintas son las circunstancias de TEM-3, TEM-10, SHV-5 y SHV-4, asociadas a aislamientos epidémicos, que configuran un grupo con marcada significación clínica. TEM-3 y SHV-4 son enzimas encontradas casi exclusivamente en Francia (19,85,124,259), identificándose en la mayoría de las especies de *Enterobacteriaceae*. Ambas BIPEA han dado lugar a brotes epidémicos amplios de infección nosocomial en más de un hospital, con más de 100 aislamientos y un número elevado de pacientes involucrados. En general, son enfermos ingresados en unidades de cuidados intensivos y en menor proporción en otras áreas de hospitalización sometidos a un tratamiento previo, generalmente prolongado, con nuevos  $\beta$ -lactámicos y aminoglicósidos. La presencia de estas BIPEA se ha asociado al fracaso terapéutico y a un 10-20% de mortalidad. En ocasiones estas

enzimas han coexistido en el tiempo con otras de espectro ampliado, CAZ-1 (TEM-5), CAZ-6 (TEM-24) (127,128), SHV-2 y SHV-3 (85).

Por otra parte, TEM-10 es una BIPEA identificada en 1988 en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en un paciente tratado con ceftazidima e ingresado en un hospital de Chicago (472). En la actualidad esta enzima se ha asociado a epidemias nosocomiales amplias en dos hospitales del mismo estado (244), con similares características a las descritas para TEM-3 y SHV-4. Recientemente se ha identificado también en los estados de Nueva York (374,578) y Pensilvania (244) y en Canada (508). Aunque el origen plasmídico parece no ser homogéneo (473), TEM-10 se ha convertido en la BIPEA más frecuentemente aislada en EEUU. Asimismo, SHV-5, BIPEA descrita inicialmente en Chile en 1987 (205), ha sido identificada en al menos otros 7 países. Recientemente se han descrito epidemias importantes que afectaron a 22 pacientes en Alemania (44) y a más de 200 en el "Massachusetts General Hospital" de Boston (249).

Un tercer grupo de  $\beta$ LPEA con repercusión clínica intermedia o moderada está constituido por aquellas enzimas que han dado lugar a brotes epidémicos limitados. Las  $\beta$ -lactamasas TEM-4,5,6,8,11,12,16,24 y 26, SHV-3 y MIR-1, constituyen los representantes característicos de este grupo cuya trascendencia clínica ha sido por el momento discreta y limitada exclusivamente a sus ámbitos de aislamiento (252,401,508). Algunas de ellas se han obtenido en más de un centro hospitalario o país, suelen afectar a un número limitado de pacientes ingresados generalmente en la misma unidad de cuidados intensivos u otras secciones, en hospitales grandes o medios, afectos de patología infecciosa variada y estado clínico diverso. Por lo general más del 50% han recibido cefalosporinas de 3ª generación y un aminoglicósido. Estas BIPEA se han caracterizado en microorganismos de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*, además de *E. coli* y *Klebsiella*, pero siempre en un número que no suele exceder de 20 aislamientos en cada episodio.

Un último epígrafe lo constituyen todas aquellas enzimas caracterizadas habitualmente en una sola cepa y en un solo lugar (aislamientos esporádicos) cuya repercusión clínica, por el momento, es extraordinariamente reducida. Este grupo sería el más numeroso e incluiría las  $\beta$ -lactamasas TEM-7,9,13,14,15,17,18,19,20,21,22,23, TEM-E1,E2(CAZ-3) y E4, CAZ-8 y CAZ-hi, MGH-1, MRH-1, CTX-2, CTX-M1 y M2, MJ-1 y 2, DJP-1, SHV-6, FPM-1, KH y MEN-1, así como las cefamicinasas CMY-1 y 2, BIL-1, MOX-1, LAT-1 y FOX-1 y la única carbapenemasa descrita en *P. aeruginosa* (TABLA 2). Sin duda, en la medida que se realicen estudios epidemiológicos más exhaustivos y el interés de microbiólogos y clínicos por estas enzimas sea mayor, las  $\beta$ -lactamasas incluidas en este último apartado podrán cambiar de grupo al conocerse su verdadera incidencia y repercusión clínica.

## **II.- OBJETIVOS**

---

El planteamiento de este trabajo y su desarrollo se ha dirigido a la consecución de los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar la incidencia y evolución de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacteriaceae* en el Hospital Ramón y Cajal durante el sexenio 1987-1992, analizando para cada género o especie los fenotipos de sensibilidad-resistencia a estos antimicrobianos con especial atención al fenotipo determinado por las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado (BIPEA).
- 2.- Analizar la expresión fenotípica conferida por diferentes prototipos de BIPEA en *Escherichia coli* K12 BM21; establecer grupos fenotípicos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y estudiar la influencia de mutaciones que afectan a la permeabilidad (*ompF*<sup>-</sup>) en la expresión fenotípica de las BIPEA.
- 3.- Analizar la capacidad de detección fenotípica e identificación presuntiva de BIPEA en *Enterobacteriaceae* por diferentes sistemas de determinación de la sensibilidad "in vitro".
- 4.- Determinar la incidencia de BIPEA en *Enterobacteriaceae* aisladas en nuestro Hospital durante el período 1987-1992, su distribución en las diferentes especies bacterianas y los factores epidemiológicos asociados.
- 5.- Caracterizar las BIPEA identificadas, determinar el fenotipo de resistencia conferido por cada enzima o grupos de enzimas y estudiar los mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos en *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

### **III.- MATERIAL Y METODOS**

---

## 1.- MICROORGANISMOS.

### 1.1.- Aislamientos clínicos.

El estudio de sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se realizó prospectivamente en 24.058 aislamientos de *Enterobacteriaceae* procedentes, en su mayoría, de pacientes ingresados en el Hospital Ramón y Cajal y, en menor número, de pacientes atendidos en el Servicio de Urgencias o Ambulatorios pertenecientes al Área sanitaria nº 4 del municipio de Madrid. Estos microorganismos se aislaron durante el período comprendido entre el 1 de marzo de 1987 y el 31 de diciembre de 1992. Su distribución por especies bacterianas y procedencia clínica se recoge en la TABLA 5.

**TABLA 5.- Aislamientos de *Enterobacteriaceae* y origen clínico.**

Microorganismos	Nº Total	Hemocultivos	Urocultivos	Coprocultivos	Líquidos orgánicos	Exudados	
						quirúrg.	respirat.
<i>E. coli</i>	14.234	7,4 <sup>a</sup>	71,6	0,1	1,9	6,7	2,3
<i>Salmonella spp.</i>	959	15,6	1,6	80,9	0,2	1,6	0,1
<i>P. mirabilis</i>	2.634	2,0	54,5	-----	1,3	36,2	6,0
<i>K. pneumoniae</i>	1.674	7,0	55,4	-----	2,0	28,7	6,9
<i>K. oxytoca</i>	693	6,2	24,8	-----	4,7	48,7	15,6
<i>P. vulgaris</i>	171	0,6	46,6	-----	2,3	41,3	9,2
<i>E. cloacae</i>	1.380	8,2	19,3	-----	2,5	50,2	19,8
<i>E. aerogenes</i>	254	4,1	10,1	-----	0,4	77,5	7,9
<i>C. freundii</i>	520	4,0	52,0	7,8	2,6	25,6	9,0
<i>M. morganii</i>	479	4,4	32,5	-----	3,6	52,6	6,9
<i>S. marcescens</i>	1.060	5,7	24,1	-----	6,9	52,8	10,5
<b>TOTAL</b>	<b>24.058</b>	<b>6,8</b>	<b>57,4</b>	<b>3,4</b>	<b>2,1</b>	<b>25,3</b>	<b>5,0</b>

<sup>a</sup>: porcentaje de aislamientos.

### 1.2.- Cepas con $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado.

#### 1.2.1.- Procedentes de muestras clínicas.

Se aislaron un total de 80 cepas de *Enterobacteriaceae* con un perfil de resistencia compatible con la presencia de BIPEA. Este perfil se caracteriza por la resistencia o menor sensibilidad a aminotiazol-cefalosporinas y monobactams y sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos provistos de un grupo metoxi en C<sub>6</sub> ó C<sub>7</sub> y a carbapenems. Asimismo, la sinergia entre cefalosporinas de 3<sup>a</sup>

generación o monobactams y el ácido clavulánico facilitó su identificación presuntiva. Las BIPEA se caracterizaron por las técnicas detalladas en el apartado 4.

La **identificación bioquímica** de estos microorganismos se realizó por el sistema semiautomático PASCO (DIFCO, Detroit, MI) y el sistema API 20E (Bio Mérieux SA, Montalieu-Vercieu, Francia). La **identificación serológica** de las cepas de *Salmonella* se realizó con antisueros de antígeno somático y flagelar (Bacto Salmonella O Antisera; Bacto Salmonella H Antisera; Vi Antiserum, DIFCO, Detroit, MI) siguiendo los diferentes trabajos de White (604,605) y Kauffman (272,273,274,275), recogidos posteriormente por Edwards y Ewing (152,159).

### 1.2.2.- Procedentes de portadores fecales.

Con el patrón de resistencia referido en el epígrafe anterior se estudiaron un total de 7 cepas de *Enterobacteriaceae* procedentes de 1.239 muestras de heces, obtenidas de 544 pacientes atendidos en régimen ambulatorio en 3 Áreas sanitarias del municipio de Madrid (Área 6: Ambulatorio de Argüelles; Área 5: Ambulatorio de Bravo Murillo; Área 4: pacientes ambulatorios del Hospital Ramón y Cajal) y 305 pacientes ingresados en el Hospital Ramón y Cajal durante un período de 9 meses (abril-diciembre de 1991). Estas cepas fueron seleccionadas en dos placas de agar de MacConkey que contenían cefotaxima (1 µg/ml) y ceftazidima (1 µg/ml), respectivamente.

### 1.3.- Cepas de referencia.

Para el control de calidad de los estudios de sensibilidad se utilizaron las cepas recomendadas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)(396,397,398,399): *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas con prototipos de β-lactamasas utilizadas en los estudios de sensibilidad y caracterización de las BIPEA se recogen en la TABLA 6.

En los estudios de transferencia de la resistencia mediada por las BIPEA y de cotransferencia de resistencia a antibióticos no β-lactámicos, se utilizaron las siguientes cepas receptoras de plásmidos conjugativos: *E. coli* K12 BM21 resistente al ácido nalidíxico ( $F^- gyrA \lambda^+$ ) (27), *E. coli* K-12 J53-2 resistente a la rifampicina (*metF63 rpoB22*) (108) y *E. coli* K12 HB101 resistente a la estreptomicina ( $F^- hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 supE44 \lambda^-$ ) (72). En algunos casos se introdujo por transformación ADN plasmídico en cepas competentes de *E. coli* K-12 TG1 [ $\Delta$  (*lac-pro*) *supE thi hsdD5*  $F'(traD36 proAB lacI^q lacZ \Delta$  M15)] (370).

En el estudio de la influencia de las alteraciones de la membrana externa en la expresión de las  $\beta$ IEPA se utilizaron dos cepas isogénicas de *E. coli* (una de ellas *ompF*<sup>-</sup>) cedidas gentilmente por F. Moreno (Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid): *E. coli* MC4100 [*F*<sup>-</sup>*araD139*Δ(*lac IPOZYA-argF*)U169 *rpsL thiA relA fla*] (104) y *E. coli* MH621 [MC4100 (*ompF*<sup>-</sup>-*lacZ*)/*hyb16-21*] (212).

**TABLA 6.-** Cepas con prototipos de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas y de espectro ampliado.

Microorganismo	Plásmido o nombre de la cepa	Enzima	pI	Referencia
<i>E. coli</i>	R6K	TEM-1	5,4	222
<i>E. coli</i>	1725E(RP1)	TEM-2	5,6	222
<i>K. pneumoniae</i>	CF104	TEM-3 (CTX-1)	6,3	534
<i>E. coli</i>	J53-2(pUD16)	TEM-4	5,9	437
<i>E. coli</i>	pCF604	TEM-5 (CAZ-1)	5,55	540
<i>E. coli</i>	B8083101	TEM-6	5,87	42
<i>E. coli</i>	ClA(pCIF100)	TEM-7 (TEM-201)	5,41	111
<i>E. coli</i>	BM2990	TEM-8	5,9	324
<i>E. coli</i>	J53(pCFF34)	CAZ-2	5,9	130
<i>E. coli</i>	ClA(pBR322-C3)	TEM-12 (TEM-101)	5,25	111
<i>E. coli</i>	RYC1000(pBGTEM-17)	TEM-17	5,9	68
<i>E. coli</i>	RYC1000(pBGTEM-LM)	TEM-LM	5,9	68
<i>E. coli</i>	RYC1000(pBGTEM-Hal)	TEM-Hal	5,4	68
<i>E. coli</i>	RYC1000(pIRT-3)	IRT-3	5,4	66
<i>E. coli</i>	J53(R1010)	SHV-1	7,6	34
<i>E. coli</i>	JC2926(pBP60-1)	SHV-2	7,6	279
<i>E. coli</i>	J53-2(pUD18)	SHV-3	6,98	406
<i>E. coli</i>	J53-2(pUD21)	SHV-4 (CAZ-5)	7,75	446
<i>E. coli</i>	J53-2(pAEF2)	SHV-5 (CAZ-4)	8,2	205
<i>E. coli</i>	ClA(pSLH47)	SHV-6	7,6	17
<i>E. coli</i>	1727E(RGN238)	OXA-1	7,4	359
<i>E. coli</i>	1894E(R57b)	OXA-3	7,1	359
<i>E. coli</i>	HB101(pMON400)	ROB-1	8,1	366
<i>E. cloacae</i>	RYC11439/89	$\beta$ l-cromosómica	8,8	100

## 2.- ANTIMICROBIANOS.

Los antibióticos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas fueron suministrados en forma de sustancia valorada por los diferentes laboratorios fabricantes: ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, carbenicilina, ticarcilina, temocilina, cefminox, ceftizoxima, ácido clavulánico y BRL 42715B (SmithKline Beecham Pharmaceuticals); cefazolina, cefalotina, cefaclor, moxalactam, tobramicina y apramicina (Lilly Indiana de España); cefoxitina, imipenem y norfloxacin (Merck Sharp & Dohme);



cefuroxima, ceftazidima y nitrocefin (Glaxo); cefixima (Merck Igoda); cefotaxima, cefpiroma y ofloxacin (Hoechst Ibérica); azlocilina, mezlocilina y ciprofloxacina (Química Farmacéutica Bayer); piperacilina, tazobactam y biapenem (Lederle-Cyanamid Ibérica); sulbactam (Pfizer); ceftriaxona y carumonam (Roche); aztreonam, kanamicina y ampicacina (Bristol Myers-Squibb); cefotetan y meropenem (Zeneca); cefdinir (Parke-Davis); ceftibuten, gentamicina, netilmicina, sisomicina y 5-episisomicina (Schering-Essex España); ácido nalidixico y cloranfenicol (Sigma Chemical Co.); estreptomycin y fosfomicina (CEPA); espectinomycin (Upjohn); dibecacina y bleomicina (Almirall); neomicina (Liade); esparfloxacina (Rhône-Poulenc Rorer); temafloxacina (Abbott Laboratories) y rifampicina (Merrell Dow).

Los discos de antibióticos fueron suministrados por Oxoid (Basingstoke, UK), Diagnostic Pasteur (Marnes-la-Coquette, Francia) y Mast Laboratories Ltd. (Merseyside, UK). Los discos de cefpiroma y carumonam fueron preparados en nuestro laboratorio, con una carga de 30 µg.

### **3.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.**

#### **3.1.- Método de difusión con disco.**

Con posterioridad a la detección presuntiva por microdilución de las cepas con BIPEA se estableció un perfil de sensibilidad utilizando la técnica de difusión con disco descrita por **Bauer y cols.** (35) y recogida con algunas modificaciones por el NCCLS (396,398).

#### **3.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).**

##### **3.2.1.- Método de dilución en agar.**

Esta técnica se realizó siguiendo las indicaciones de **Ericsson y Sherris** (156) con las modificaciones y recomendaciones introducidas posteriormente por el NCCLS (397,399). Se utilizó un replicador de **Steers** (555) y agar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK) como medio de cultivo al que se incorporaron los antibióticos en diluciones en base 2. El inóculo bacteriano empleado fue de  $10^5$  UFC/depósito. Además, con el fin de conocer la influencia del incremento del inóculo en los valores de CMI obtenidos en las cepas productoras de BIPEA, se utilizó un inóculo de  $10^3$  y  $10^7$  UFC/depósito. La lectura de la CMI (menor concentración de antibiótico que impide el desarrollo de crecimiento visible en la superficie del agar) se realizó tras 18 h de incubación a 35 °C.

Se utilizaron los valores de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ), para establecer los **grupos fenotípicos** de las distintas BIPEA, la **influencia de las mutaciones *ompF*** en la expresión de las BIPEA y la **resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos**.

### **3.2.2.- Método de microdilución.**

El estudio de la sensibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y su evolución en el período anteriormente reseñado se realizó utilizando los datos generados por el sistema semiautomático PASCO (Difco, Detroit, MI), que emplea paneles con diferentes sustratos para la identificación bioquímica de los microorganismos y con concentraciones de antimicrobianos en base 2 para la determinación de la CMI (Ref. paneles 66E y 5E). A diferencia de otros equipos, en el sistema PASCO la lectura de la CMI se establece visualmente por el usuario y no de forma automática, lo cual permite detectar anomalías en el crecimiento bacteriano, contaminaciones y efectos paradójicos. Los paneles, con anterioridad a su utilización, se almacenaron congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El inóculo bacteriano de  $5 \times 10^5$  UFC/ml fue similar al recomendado por el NCCLS para la determinación de la CMI por el método estandar de microdilución (399), realizándose la lectura de los paneles tras 18 h de incubación a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.3.- Método del "Epsilon-Test".**

Con objeto de establecer criterios fenotípicos de diferenciación entre las distintas BIPEA se compararon las técnicas de dilución en agar, microdilución y difusión con disco con el sistema Epsilon-Test (E-Test) recientemente desarrollado (AB Biodisk, Solna, Suecia) (12,70,77). Este método utiliza placas de agar convencionales y una tira de papel de  $5 \times 50\text{ mm}$  cargada con un antibiótico en concentraciones decrecientes desde 256 a  $0,016\text{ }\mu\text{g/ml}$ , que permite una graduación más amplia en el rango de concentraciones (29 diluciones) frente al sistema tradicional de dilución en agar (15 diluciones en base 2). El inóculo bacteriano se preparó a partir de 3-4 colonias inoculadas en un tubo con solución salina (0,9%) ajustando la turbidez al tubo 0,5 de la escala de McFarland. La inoculación de las placas (Mueller-Hinton) se realizó con una torunda estéril siguiendo la técnica preconizada por el NCCLS para el método de difusión por disco (398), depositando posteriormente la tira con el antibiótico sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron durante 18 h a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , considerando como valor de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) el punto de intersección entre el crecimiento bacteriano sobre la superficie del agar y la tira del E-Test (FIGURAS 13 y 19).

### **3.3.- Estudio con inhibidores de $\beta$ -lactamasas.**

#### **3.3.1.- Prueba de doble difusión con discos.**

En la identificación inicial de las cepas con BIPEA se incluyó la técnica de doble difusión con discos descrita por Jarlier y cols. (259). Se realizó un antibiograma convencional empleando discos con carga estándar (30  $\mu$ g) de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam dispuestos a una distancia de 25-30 mm de discos con amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu$ g). La aparición de un halo ampliado en alguna de las cefalosporinas de 3ª generación fue indicativo de la posible presencia de una BIPEA.

#### **3.3.2.- Sinergia con inhibidores de $\beta$ -lactamasas.**

Se determinó la CMI de amoxicilina, piperacilina, cefotaxima, cefpiroma, ceftazidima, aztreonam y cefoxitina en presencia de 5  $\mu$ g/ml de ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y BRL 42715B.

#### **2.3.4.- Puntos críticos de resistencia.**

Los puntos críticos de resistencia (PCR), utilizados para la definición de los fenotipos de sensibilidad-resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (TABLA 7), se eligieron en función de los puntos críticos de resistencia microbiológica (PCRM) establecidos según la distribución del número de cepas por cada concentración de antibiótico (340). El PCRM se definió como la concentración de antibiótico más alta capaz de detectar la población microbiológica más sensible (371). En el sistema de diluciones dobles para el cálculo de la CMI, el PCRM viene dado por la concentración de antibiótico que cubre el primer pico en la distribución del número de cepas, y estaría representado por la concentración crítica más cercana al punto de inflexión de la curva a partir del primer pico en esta distribución (340).

A efectos prácticos el PCRM se corrigió considerando el valor del punto crítico farmacocinético (PCF) (133,182,262) de acuerdo con los siguientes criterios:

- si el PCRM es inferior al PCF se tomó aquél como PCR.
- si el PCRM es superior al PCF se tomó este último como PCR.

TABLA 7.- Puntos críticos de resistencia en *Enterobacteriaceae*.

Microorganismo	Puntos críticos de resistencia ( $\geq \mu\text{g/ml}$ )							
	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ
<i>E. coli</i>	16	32	16/8	8	8	8	1	1
<i>Salmonella spp.</i>	16	32	16/8	8	8	8	1	1
<i>P. mirabilis</i>	16	32	16/8	16	16	16	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	16	32	16/8	16	16	16	1	1
<i>K. oxytoca</i>	16	32	16/8	16	16	16	1	1
<i>P. vulgaris</i>	16	32	16/8	16	16	16	1	1
<i>E. cloacae</i>	16	32	16/8	16	16	16	2	2
<i>E. aerogenes</i>	16	32	16/8	16	16	16	2	2
<i>C. freundii</i>	16	32	16/8	16	16	16	2	2
<i>H. morganii</i>	16	32	16/8	16	16	16	2	2
<i>S. marcescens</i>	16	32	16/8	16	16	16	4	2

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina;  
 KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina;  
 CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

#### 4.- CARACTERIZACION DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

La caracterización de las  $\beta$ PEA en las 80 cepas clínicas con un perfil de resistencia compatible con la presencia de estas enzimas se basó en la determinación del punto isoeléctrico (pI), en la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitroceftín y en la hibridación con sondas de ADN específicas de las familias TEM y SHV.

##### 4.1.- Obtención del extracto crudo enzimático.

Los extractos crudos enzimáticos fueron preparados por sonicación (583). Para ello, se subcultivó 1 ml de un cultivo de 18 h en 40 ml de caldo Luria-Bertani (LB) (335), incubándose en agitación durante 4 h a 35 °C. Tras este período, en el que el cultivo está en fase de crecimiento exponencial, se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Eliminado el sobrenadante, se lavó y resuspendió el depósito con tampón fosfato 15 mM pH 7,2. Tras un nuevo proceso de centrifugación, se resuspendió en 3 ml del mismo tampón y se procedió a su sonicación en hielo (Sonicator W-30, Heat Systems. Ultrasonics Inc., Farmingdale NY), utilizando 3-4 ciclos de 30 segundos. El sonificado se clarificó por centrifugación a 12.000 rpm a 4 °C, confirmando la actividad

$\beta$ -lactamasa añadiendo 5  $\mu$ l de éste a 5  $\mu$ l de nitrocefin 100  $\mu$ M (Oxoid, Basingstoke, UK). El cambio de color del nitrocefin del amarillo al rojo evidenció la presencia de  $\beta$ -lactamasa.

#### **4.2.- Determinación del punto isoelectrico.**

Se depositaron los extractos crudos sonicados (2  $\mu$ l) en geles comerciales de poliacrilamida con anfolitos de rangos de pH de 3 a 9, de 5 a 8 y de 4,5 a 6 (PhastGel 3-9, PhastGel 5-8 y PhastGel 4,5-6, Pharmacia, Uppsala, Suecia). EL isoelectroenfoque de las muestras se realizó según la técnica descrita por Huovinen (241) utilizando el aparato denominado Phastsystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en las condiciones establecidas por el fabricante. Paralelamente al enfoque de los extractos problema se realizó el de las cepas con las  $\beta$ -lactamasas prototipos de pl conocido, determinándose el de aquéllas por comparación. La visualización de las bandas de las  $\beta$ -lactamasas en los geles se realizó añadiendo 100  $\mu$ l de una solución de nitrocefin 100  $\mu$ M.

#### **4.3.- Determinación de la actividad enzimática específica.**

##### **4.3.1.- Determinación del contenido de proteínas.**

Se realizó por espectrofotometría en los extractos crudos sonicados utilizando un sistema comercial (BCA, Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL) basado en la técnica descrita por Lowry y cols. (318). Este sistema emplea el ácido bicinconfínico como cromógeno que reacciona con el  $\text{Cu}^+$  resultante de la reacción alcalina de las proteínas con el  $\text{Cu}^{2+}$ . La lectura de la absorbancia del complejo final [ $\text{Cu}^+$ -2(ácido bicinconfínico)] se realiza a 562 nm. El contenido proteico se cuantificó por medio de una curva patrón de albúmina sérica.

##### **4.3.2.- Actividad $\beta$ -lactamasa.**

La técnica empleada se basó en la descrita por O'Callaghan (422) que emplea nitrocefin como sustrato (500). Se utilizó un espectrofotómetro Gilford 250 (Gilford Instruments Laboratories Inc., Oberlin, OH) con lectura de la absorbancia a 482 nm. Se añadieron 10-100  $\mu$ l de los extractos enzimáticos, previamente diluidos en tampón fosfato 15 mM pH 7, a 1 ml de una solución de nitrocefin 10  $\mu$ M a 25 °C, determinándose el incremento de la absorbancia en el tiempo correspondiente a la hidrólisis del nitrocefin. A partir de este valor y utilizando el coeficiente de extinción molar del nitrocefin se calculó la actividad de  $\beta$ -lactamasa expresada en micromoles de sustrato hidrolizado por minuto y volumen añadido ( $\mu$ mol/ml) a 25 °C y pH 7. Referido este valor

a los mg de proteína del extracto se obtuvo la actividad enzimática específica (mU/min/mg). Los valores finales son el resultado de la media de al menos dos determinaciones.

#### 4.4.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefn.

Esta técnica, desarrollada por Papanicolaou y Medeiros (434), se empleó para la caracterización de las distinta BIPEA. El ensayo se fundamentó en el cambio de la densidad óptica determinado por la hidrólisis del nitrocefn por la acción de las  $\beta$ -lactamasas en presencia de diversos substratos (competidores e inhibidores). Se emplearon placas de microtitulación de fondo plano (EIA/RIA 3590, Costar Cambridge, MA) en las que se dispensaron 50  $\mu$ l de una solución de nitrocefn (100  $\mu$ M) y del substrato en tampón fosfato 0,1 M pH 7 a las concentraciones indicadas en la TABLA 8. En los pocillos control se sustituyó el substrato por tampón fosfato 0,1 M pH 7.

Posteriormente, se diluyeron los extractos en tampón fosfato 0,1 M pH 7 hasta obtener un valor de absorbancia a 480 nm de 0,2 a los 2 minutos de iniciarse el ensayo. Las determinaciones se realizaron por duplicado añadiendo 50  $\mu$ l de los extractos diluidos a los pocillos con los substratos (nitrocefn + competidor/inhibidor) y a los pocillos control (nitrocefn), midiéndose el cambio de densidad óptica a 480 nm a los 2, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos en un espectrofotómetro de enzimoimmunoensayo (Flow Titertek Multiskan Plus Mk II, Flow laboratories, Ayrshire, NB).

**TABLA 8.-** Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefn.

Substrato	Concentración final		Substrato	Concentración final	
	mg/ml	$\mu$ M		mg/ml	$\mu$ M
Nitrocefn	0,025	50	Cefoxitina	2,5	5500
Cloxacilina	0,23	520	Cefotetan	0,5	870
Clavulánico	0,0005	2	Cefotaxima	2,5	5000
Sulbactam	0,005	20	Ceftazidima	1,25	2000
Tazobactam	0,001	3	Aztreonam	0,5	1150
Cefuroxima	0,5	1180	Imipenem	0,31	980
Ceftibuten	2,0	3200			

Se calculó el porcentaje de inhibición (% ICN) aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ICN} = 100 - \left(1 - \frac{S}{C}\right)$$

S = DO<sub>480</sub> pocillo substrato  
C = DO<sub>480</sub> pocillo control

El porcentaje máximo de inhibición se observó generalmente a los 2 ó 5 minutos de iniciado el ensayo. Cuando el porcentaje máximo de inhibición excedió del 25%, se calculó el grado de disminución del porcentaje de inhibición o pendiente aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pendiente} = \frac{\text{máximo \% inhibición} - \% \text{ inhibición 10 minutos}}{10}$$

En la caracterización de las enzimas estudiadas se utilizó el porcentaje de inhibición máximo, la representación gráfica del porcentaje de inhibición en función del tiempo y el valor de la pendiente, en comparación con los respectivos valores de las  $\beta$ -lactamasas de pl conocido.

#### 4.5.- Hibridación en colonia con sondas de ADN.

##### 4.5.1.- Preparación y lisis de las colonias.

Sobre la superficie de agar LB con un crecimiento de 4-6 h a 37 °C de colonias perfectamente aisladas se depositó una membrana de nitrocelulosa (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Tras un minuto de contacto, en el que se adsorbieron las colonias, se retiró la membrana y se depositó con las colonias hacia arriba en una solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) durante 7 minutos. Tras este período se neutralizó, durante 3 minutos, en una solución de NaCl 1,5 M; Tris Cl 0,5 M pH 7,2; Na<sub>2</sub>EDTA 0,001 M, repitiendo nuevamente este proceso. Posteriormente se lavaron las membranas dos veces con una solución 2xSSC (solución 20xSSC: NaCl 3M; citrato sódico 0,3 M) y una vez eliminada la humedad se fijó el ADN en una cámara de luz u.v. siguiendo las instrucciones del fabricante (GS Gene Linker<sup>TM</sup>, Bio-Rad Laboratories, Richmond CA).

##### 4.5.2.- Preparación y marcado de las sondas.

Se utilizó el fragmento *SspI/PstI* de 560 pb del plásmido PBR322 (131) como sonda específica de tipo TEM y el fragmento interno de 450 pb, obtenido tras digestión del plásmido pHUC37 con *PstI/NorI* (sonda intragénica de SHV-3), como sonda específica de la familia SHV (406). El marcado de estos

dos fragmentos se realizó por el método de incisión ambulante ("nick translation") con un equipo comercial (BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg MD), utilizando ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP como nucleótido radiactivo (Amersham International plc, Amersham, UK).

#### **4.5.3.- Hibridación y autorradiografía.**

Con anterioridad a la hibridación, se depositaron las membranas preparadas en el apartado 4.5.1. en un horno de hibridación (Techne Hybridizer HB-1, Techne Ltd., Cambridge, UK) con 40 ml de solución de prehibridación [6xSSC; 5x solución de Denhardt; lauril sulfato sódico 0,5% (SDS); 50  $\mu$ l espermatozoos de salmón 10 mg/ml (solución de Denhardt: SDS 2%; Ficoll-400 2%; polivinilpirrolidona 2%)] durante 1 h a 65 °C en los términos indicados por el fabricante.

La hibridación con las sondas marcadas se realizó, en el horno antes citado, durante 12 h a 65 °C con 40 ml de la solución utilizada para la prehibridación (en este caso sin espermatozoos de salmón). Tras este período y eliminada la solución anterior con la sonda marcada se lavaron las membranas con una solución de 2xSSC; SDS 0,05% durante 1 h a 65 °C y después con 0,1xSSC; SDS 0,5% durante 1 h a 65 °C. Una vez secas, se introdujeron las membranas en pantallas amplificadoras durante 6-48 h a -40 °C para realizar posteriormente una autorradiografía.

### **5.- ESTUDIOS GENETICOS.**

#### **5.1.- Extracción del ADN plasmídico.**

##### **5.1.1.- Lisis clara.**

Se utilizó el ADN plasmídico obtenido por este método (107), previa purificación, para medir el tamaño molecular de los plásmidos. Partiendo de un cultivo en 40 ml de LB se centrifugó y lavó con TE (Tris Cl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8). El depósito se resuspendió en 1,25 ml de una solución que contenía sacarosa 20%, EDTA 40 mM pH 8 y Tris Cl 50 mM pH 8 a la que se añadió 0,25 ml de lisozima 1%, incubándose 30 minutos a 25 °C. Posteriormente se añadió 0,5 ml de EDTA 0,25 M pH 8 dejándolo actuar 10 minutos a 0 °C. A continuación se agregaron 2 ml de una solución que contenía Tritón 0,1%, EDTA 62,5 mM y Tris Cl 50 mM pH 8, manteniéndose 10 minutos en hielo y centrifugándose a 15.000 rpm 60 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se mantuvo a 65 °C durante 15 minutos, enfriándose en hielo y centrifugándose a 5.000 rpm 15 minutos a 4 °C. Recogido el sobrenadante, se añadió 1/3 del volumen de éste de PEG (40%



polietilenglicol en NaCl 2 M) y se mantuvo al menos 12 h a 4 °C. Tras este período se centrifugó a 9.000 rpm durante 15 minutos y se recogió el depósito en 100-150  $\mu$ l de TE o agua destilada, desionizada y estéril.

### **5.1.2.- Lisis alcalina.**

Para la visualización de los plásmidos en las cepas con BIPEA y en sus respectivos transconjugantes, se utilizó esta técnica descrita por Birnboim y Doly (64) y modificada por Horowicz (335).

El depósito del centrifugado de 1 ml de cultivo de 18 h se lavó con TE y resuspendió en 100  $\mu$ l de una solución que contenía glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris Cl 25 mM pH 8,0, manteniéndose a 25 °C durante 5 minutos. Se añadieron 200  $\mu$ l de NaOH 0,2 N y 1% SDS, mezclándose suavemente durante 5 minutos. Tras este período se mezcló durante 5 minutos con 150  $\mu$ l de una solución de acetato potásico 3 M y acético glacial 11,5% en agua, centrifugándose a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante ( $\pm 400$   $\mu$ l) se transfirió a un nuevo tubo y se eliminaron las proteínas con fenol/cloroformo. Recogido el sobrenadante, tras una nueva centrifugación, se añadió 1/10 de su volumen ( $\pm 40$   $\mu$ l) de acetato sódico 3 M pH 5,2 y posteriormente 800  $\mu$ l de etanol. Se mantuvo 1 h a -20 °C y se centrifugó 15-30 minutos a 4 °C eliminando el sobrenadante. El ADN presente en el depósito se lavó con etanol 75% (0,5 ml) y centrifugó 2 minutos, descartando nuevamente el sobrenadante. Secado a vacío se resuspendió en TE pH 8,0 con ARNasa (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania).

### **5.1.3.- Purificación del ADN plasmídico.**

La purificación del ADN plasmídico, obtenido mediante lisis clara (107), se realizó de acuerdo con el método descrito por Guerry (201) que utiliza una separación por centrifugación con un gradiente de densidad de cloruro de cesio.

El ADN plasmídico, previamente obtenido, fue llevado a 9 ml de tampón TE y se añadieron 9 gr de CICs y 10 mg de bromuro de etidio. Una vez homogeneizado se introdujo en un tubo de ultracentrífuga (Beckman, Palo Alto CA) y sellándose adecuadamente se centrifugó a 38.000 rpm 48 h a 20 °C (Centricon T-1075, Kontron Instruments, Zurich, Suiza). El ADN plasmídico, visualizado con luz u.v., se extrajo por aspiración con una jeringa hipodérmica. El bromuro de etidio que acompañaba al ADN plasmídico se eliminó con CICs a saturación en isopropanol. Posteriormente se dializó en TE pH 8,0 a 4 °C durante 48 h (Dialysis Tubing Medicell, International Ltd., London, UK).

El ADN así obtenido se concentró por precipitación con acetato sódico pH 5,2 a una concentración final 0,3 M y un volumen igual de isopropanol. Se mantuvo a -20 °C durante 2 h, centrifugándose posteriormente a 4 °C. El depósito, con el ADN plasmídico, se lavó con etanol 70%, centrifugó nuevamente y secó a vacío. Finalmente se resuspendió en agua destilada, desionizada y estéril.

#### 5.1.4.- Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis del ADN se realizó en geles de agarosa 0,6-0,8% (Bio-Rad Laboratories, Richmond CA) en tampón TBE (10,8% Tris; 5,7% ácido bórico; 0,93% EDTA) (335). El ADN se visualizó, previo tratamiento con bromuro de etidio, por transiluminación del gel con luz u.v.

#### 5.1.5.- Medida del tamaño molecular de los plásmidos.

Para determinar el tamaño del plásmido(s) que codificaba(n) la  $\beta$ IPEA implicada en la única epidemia acaecida en nuestro hospital, el ADN plasmídico purificado de las cepas de *S. arizonae* (36536/89) y *E. coli* (5H/89) se digirió con *EcoRI* siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Por comparación del patrón de restricción obtenido con el de los fragmentos de tamaño conocido resultantes del tratamiento del ADN del fago  $\lambda$  con *HindIII* se determinó el tamaño aproximado de los plásmidos (335) que codificaban la  $\beta$ -lactamasa.

#### 5.2.- Transferencia de la resistencia.

La transferencia del ADN plasmídico se realizó por conjugación (376), recurriendo a la transformación cuando no fue posible obtener transconjugantes (137). La obtención de transformantes por electroporación fue empleada en el estudio de las mutaciones *gyrA* responsables de la resistencia a quinolonas en las cepas productoras de  $\beta$ IPEA.

##### 5.2.1. Conjugación y frecuencia de conjugación.

La conjugación se realizó en medio sólido (agar Columbia con sangre de carnero 5%) utilizando como soporte membranas estériles de fosfocelulosa dispuestas en piezas de 1 cm<sup>2</sup> sobre la superficie del agar. Las cepas donantes, con plásmidos que codifican las  $\beta$ IPEA, y las cepas receptoras de *E. coli* (BM21, HB101 y J53) se cultivaron en LB hasta alcanzar la fase exponencial. Se añadieron 25  $\mu$ l del cultivo de la cepa receptora sobre la superficie de la membrana, manteniéndose a temperatura ambiente hasta su desecación. Posteriormente se añadieron, sobre el depósito anterior, 25  $\mu$ l de la

cepa donante, incubándose, una vez seco, 18 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, la membrana con el crecimiento bacteriano se transfirió a un tubo con 9 ml de LB y se agitó hasta obtener una suspensión del crecimiento bacteriano. Se subcultivaron alícuotas de ésta en medios selectivos con ácido nalidíxico, estreptomycinina o rifampicina (100 µg/ml) y ampicilina (50 µg/ml), cefotaxima o ceftazidima (en concentraciones entre 0,5 y 4 µg/ml según la CMI del donante). Como controles se emplearon la cepa donante y la receptora.

La **frecuencia de conjugación** se expresó como el número de células receptoras que adquirieron el plásmido con la BIPEA en 1 h a 37 °C respecto al número de células donantes (376). Para ello, la cepa donante se cultivó en LB hasta alcanzar la fase exponencial ( $10^8$  UFC/ml) y la cepa receptora hasta alcanzar la fase estacionaria ( $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml). Se mezclaron 5 ml de cada cultivo y se mantuvieron 1 h a 37 °C con agitación suave. Inmediatamente se sometieron a agitación fuerte durante 1 minuto y se enfrió a 0 °C. La cuantificación del número de células donantes se realizó plaqueando sobre medios selectivos con cefotaxima o ceftazidima (0,5-4 µg/ml) y se calculó el número de células receptoras que adquirieron el plásmido de resistencia seleccionando sobre los medios indicados en el párrafo anterior.

### **5.2.3.- Transformación.**

El método seguido fue descrito por **Dagert y Ehrlich** (137) que utiliza células competentes de *E. coli* obtenidas por la acción del  $\text{CaCl}_2$ . En la preparación de las células competentes se partió de un cultivo de 18 h de *E. coli* HB101 o *E. coli* TG1. Subcultivado en 40 ml de LB (1:100) se hizo crecer hasta obtener una densidad óptica de 0,3-0,4 a una longitud de onda de 600 nm. Se centrifugó 5 minutos a 5.000 g 4 °C y resuspendió el depósito en 20 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM estéril. Esta suspensión se mantuvo en hielo durante 30 minutos, centrifugando nuevamente en iguales condiciones. El nuevo depósito se resuspendió en 1,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM estéril y se dejó a 4 °C 24 h para su utilización en la transformación.

En la transformación se añadieron 2-10 µl de ADN plasmídico a 100 µl de células competentes, manteniéndose en hielo durante 30 minutos. Se incubó posteriormente esta mezcla a 42 °C durante 2 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo. A continuación se añadieron 2 ml de LB, incubándose durante 2 h a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo, los transformantes se seleccionaron en agar LB con estreptomycinina (100 µg/ml) más ampicilina (50 µg/ml), cefotaxima ó ceftazidima (0,5-4 µg/ml). Como control de la transformación se empleó el plásmido pBR322 con la enzima TEM-1 y un control sin ADN.

### 5.2.3.- Transformación por electroporación.

Se utilizó este método con el fin de introducir el plásmido pBGB101 que contiene el gen salvaje *gyrA* y el gen *aphA1* que determina resistencia a la kanamicina (67) en las cepas de *Enterobacteriaceae* con *blPEA* que eran resistentes a quinolonas.

La electroporación constituye un método de transformación, descrito inicialmente para *E. coli* (148) y posteriormente para otras bacterias (170), que aumenta la eficacia de los métodos tradicionales. En la preparación de células competentes se partió de 50 ml de LB inoculado (1:100) con un cultivo de 18 h. Se incubó a 37 °C con agitación fuerte hasta obtener una densidad óptica de 0,5-0,8 a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se mantuvo posteriormente en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Eliminado el sobrenadante se resuspendió el depósito en 10 ml de agua destilada, desionizada y estéril. Tras una segunda centrifugación se resuspendió en 2,5 ml de agua destilada, desionizada y estéril y en una tercera en 1 ml de glicerol 10%. Después de una última centrifugación se resuspendió el depósito en 100-150  $\mu$ l de glicerol 10% hasta alcanzar una concentración final de células de  $1-3 \times 10^{10}$  UFC/ml. Las células competentes se congelaron en hielo seco y mantuvieron hasta su uso a -70 °C.

La electroporación se realizó en cámaras diseñadas para este fin (Gene pulser cuvetes BIO-Rad 0,1 cm, Bio-Rad Laboratories, Richmond CA) utilizando una fuente de corriente (Bio-Rad Gene Pulser, Bio-Rad Pulse Controller). Se mezclaron 40  $\mu$ l de células competentes descongeladas con 1-2  $\mu$ l de ADN plasmídico (pBGB101), dejando en hielo durante 1 minuto. Una vez añadida esta mezcla en la cámara de electroporación se sometió a un pulso de 12,5 Kv/cm durante 4-5 msec. Inmediatamente se añadió 1 ml de LB y transfirió a tubos de 17 x 100 mm de polipropileno, incubándose en agitación durante 1 h a 37 °C. La selección de las células con el plásmido pBGB101 se realizó en agar LB con kanamicina (30  $\mu$ g/ml), cloranfenicol (60  $\mu$ g/ml) y ampicilina (50  $\mu$ g/ml).

### 5.3.- Extracción del ADN cromosómico.

El ADN total de las cepas de *S. arizonae* implicadas en la epidemia por *blPEA* se extrajo por la técnica de Pitcher y cols. (459) modificada por Alonso y cols. (4). Para ello, se suspendió en tubos de Eppendorf 1 asa de cada cepa en 100  $\mu$ l de TE y trató durante 15 minutos con 500  $\mu$ l de GES (tiocianato de guanidina 5,5 M, EDTA 0,1 M, sarcosil 0,02 M) para su lisis. Posteriormente se añadió 250  $\mu$ l de acetato amónico 7,5 M y mantuvo en hielo durante 15 minutos, eliminando las proteínas con fenol-cloroformo 1:1 tal como describe Sambrook y cols. (499). La fase acuosa se mezcló con 500  $\mu$ l de isoamil alcohol-cloroformo 24:1, centrifugándose a 12.000 g durante 15

minutos. El ADN, presente en la fase acuosa, se precipitó con etanol y dejó a -20 °C durante 2 h. Tras este período, se recogió con un asa de plástico y lavó con acetato amónico 1,5 M - alcohol 70% y posteriormente con alcohol absoluto. El ADN se resuspendió en 200 µl de agua dejando 2-3 h, añadiéndose posteriormente proteinasa K (500 µg/µl) (Sigma, St. Louis Ltd. MO). Después de 1 h de incubación a 37 °C se sometió nuevamente a desproteinización con isoamil alcohol-cloroformo. El ADN resultante se trató con *EcoRI* siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia, Uppsala, Suecia), comparando los perfiles de restricción obtenidos.

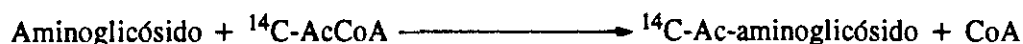
## 6.- RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS NO β-LACTAMICOS EN *Enterobacteriaceae* CON β-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

Tanto en las cepas de origen clínico como aquellas que se aislaron de portadores fecales con βIPEA se procedió al análisis de las resistencias a antibióticos no β-lactámicos: aminoglicósidos, tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y fosfomicina. El estudio se realizó en las cepas salvajes y en sus respectivos transconjugantes, determinándose la cotransferencia de las resistencias con la βIPEA. La resistencia a aminoglicósidos se evaluó con mayor detalle, caracterizándose las enzimas modificantes de aminoglicósidos. Asimismo, se estudió en las cepas salvajes la posible implicación de mutaciones en *gyrA* que confieren resistencia a quinolonas.

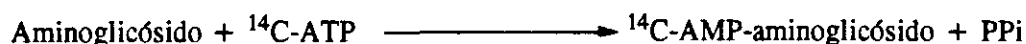
### 6.1.- Resistencia a aminoglicósidos: enzimas modificantes.

Se estudió el perfil de sensibilidad a aminoglicósidos por medio de las técnicas de dilución en agar (399) y difusión con disco (398). La caracterización de las enzimas modificantes de aminoglicósidos en las cepas con βIPEA y en sus respectivos transconjugantes se realizó en los extractos crudos obtenidos por sonicación mediante la técnica de Ozanne y cols. (430) recogida por Davies y cols. (140). Esta técnica se fundamenta en la transferencia de marcadores radiactivos desde un cofactor adecuado, - acetato, adenilato o fosfato -, al aminoglicósido. Las reacciones que tienen lugar son:

- acetilación:



- nucleotidilación:



- fosforilización:



Esta técnica se denomina también "método de adsorción al papel de fosfocelulosa", ya que el compuesto resultante de la actuación del enzima, aminoglicósido modificado y marcado radiactivamente, se une de forma covalente a un soporte de fosfocelulosa, pudiendo medir en él la radiactividad que estará en relación con la presencia del enzima (209).

Para diferenciar los distintos enzimas modificantes de aminoglicósidos se utilizaron los criterios recogidos por Miller y cols. (375) en 1980, Bryan (82), Phillips y Shannon (457) en 1984, Simuzi y cols. (528) un año después y Baquero y cols. (29) en 1989.

#### **6.1.1.- Actividad acetiltransferasa.**

Se empleó como cofactor acetilcoenzima A marcado radiactivamente ( $[1-^{14}\text{C}]\text{-AcCoA}$  6 mCi/mmol, Amersham International plc, Amersham, UK). La solución radiactiva de trabajo se ajustó a  $4\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}/\text{ml}$  con AcCoA no marcado (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) siendo la concentración final de AcCoA en la reacción de 0,825mM. La reacción de acetilación del grupo amino del aminoglicósido se desarrollo en placas de microtitulación en presencia de Tris-malato a una concentración final 0,1 M pH 5,7;  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTT (ditiotreitól) 2,5 mM ( $25\mu\text{l}$ ). La concentración final del aminoglicósido fue de 0,416 mg/ml ( $10\mu\text{l}$ ). Esta mezcla se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en presencia de  $25\mu\text{l}$  del extracto crudo sonicado de las cepas estudiadas, siendo el volumen final de la reacción de  $60\mu\text{l}$ . Se transfirió una alícuota de  $25\mu\text{l}$  de la mezcla resultante sobre un papel de fosfocelulosa de  $1\text{ cm}^2$  (Whatman P81, Balston Ltd, UK). Tras unos segundos a temperatura ambiente se sumergió 1-2 minutos en agua destilada a  $80^\circ\text{C}$ . Una vez lavados los papelillos de fosfocelulosa varias veces con agua destilada para eliminar el compuesto radiactivo que no hubiese reaccionado, se procedió al secado de los mismos en estufa a  $60^\circ\text{C}$ .

La lectura se efectuó en presencia de líquido de centelleo en un contador de radiactividad (Spectrometre a scintillation liquide SL 30, Intertechnique, Plaisir, Francia). Para cada extracto crudo sonicado de las cepas originales y sus transconjugantes se empleó agua destilada como control en lugar de la solución de antibiótico.

#### **6.1.2.- Actividad nucleotidiltransferasa.**

Para estudiar la nucleotidilación del grupo hidroxilo de los aminoglicósidos se empleó trifosfato de adenosina marcado  $[1-^{14}\text{C}]\text{-ATP}$  500 mCi/mmol (Amersham International plc, Amersham, UK). Se ajustó la solución radiactiva de trabajo a  $4\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ,  $2\mu\text{M}/\text{ml}$  con ATP no marcado (Sigma, St. Louis Ltd. MO) siendo la concentración final de ATP en la reacción de 0,33 mM. La reacción de

nucleotidilación del aminoglicósido y su lectura se desarrolló en los mismos términos expresados en el apartado anterior en presencia de Tris Cl a una concentración final de 0,1 M pH 7,8; MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, DTT 2,5 mM y 0,416 mg/ml de antibiótico.

### 6.1.3.- Actividad fosfotransferasa.

Como cofactor en la reacción de fosforilación de grupos hidroxilos se empleó ATP marcado radiactivamente ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-adenosina trifosfato 3000 Ci/mmol, Amersham International plc, Amersham, UK). Se ajustó la solución radiactiva de trabajo hasta obtener 110 cpm/pmol con ATP no marcado (Sigma, St. Louis Ltd. MO) siendo la concentración final de ATP en la reacción de 0,825 mM. La mezcla de reacción está compuesta por tampón cacodilato a una concentración final de 0,1 M pH 7; MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, DTT 2,5 mM y una concentración final de antibiótico de 0,104 mg/ml. El proceso es idéntico a los anteriores, realizándose en este caso la lectura sin necesidad de añadir líquido de centelleo.

### 6.2.- Resistencia a quinolonas: mutaciones en *gyrA*.

En el estudio de la resistencia a quinolonas se determinó la sensibilidad al ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina, temafloxacina, ofloxacina y esparfloxacina por la técnicas de dilución en agar (399) y difusión por disco (398). Asimismo, se identificó la posible implicación de alteraciones en la subunidad *gyrA* en las cepas con resistencia al ácido nalidíxico. Para ello, se siguieron las observaciones de Hane y Wood (217) que encontraron que los alelos sensibles al ácido nalidíxico de *gyrA* eran dominantes sobre los correspondientes alelos resistentes. Con posterioridad Nakamura y cols. (392) introdujeron un plásmido con un gen *gyrA* salvaje en una cepa con mutación *gyrA* que confería resistencia al ácido nalidíxico, demostrando que revertía a un fenotipo sensible.

En nuestra experiencia, se utilizó el plásmido pBGB101 (67) (cedido gentilmente por J. Blázquez, Hospital Ramón y Cajal, Madrid) con el gen *gyrA* salvaje de *E. coli* K12 clonado en el vector pACYC184 (132) junto con el gen *aphA1*, que confiere resistencia a la kanamicina. La introducción del plásmido pBGB101 en las correspondientes células competentes de las estirpes resistentes se realizó por electroporación. La preparación de las células competentes se llevó a cabo según se expresa en el apartado 5.2.3.. La disminución del valor de las CMI de las diferentes quinolonas demostró la presencia de mutaciones *gyrA*.

### **6.3.- Resistencia a tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y fosfomicina.**

La incidencia de resistencia a tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y fosfomicina en las cepas productoras de BIPEA y en sus respectivos transconjugantes se realizó estudiando el perfil de sensibilidad por las técnicas de dilución en agar (399) y difusión por disco (398).

## **7.- ANALISIS EPIDEMIOLOGICO.**

### **7.1.- Datos microbiológicos.**

Se analizó el número de microorganismo con BIPEA, así como el género, especie y origen clínico de los mismos. Este análisis discierne tanto los aislamientos únicos de un solo microorganismo en una sola muestra y en una sola fecha como los aislamientos múltiples de sólo un microorganismo en muestras distintas y fechas diferentes.

### **7.2.- Pacientes y factores asociados.**

Se revisaron los datos clínicos (historia clínica) de los pacientes con *Enterobacteriaceae* con BIPEA, agrupándose según su origen en pacientes de servicios quirúrgicos o unidades de cuidados intensivos, de servicios del área médica y pacientes atendidos en el Servicio de Urgencia o por las consultas externas del Hospital (origen extrahospitalario). De acuerdo con los datos recogidos en la historia clínica se determinó si existían criterios de infección o se trataba de una colonización bacteriana (74). Asimismo, se analizó la duración de la estancia hospitalaria, el tratamiento antibiótico previo al aislamiento, duración del mismo, así como el tratamiento posterior al aislamiento de las cepas con BIPEA y la evolución clínica.

## **8.- METODOS ESTADISTICOS.**

El estudio estadístico de la evolución de la sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se realizó con el programa de estadística SIGMA (versión R-SIGMA, Horus Hardware, 1990), considerando diferencias significativas a aquellos valores de  $p$  inferiores a 0,05 (prueba de la  $X^2$ ). La correlación entre los valores de actividad enzimática y CMI para cefotaxima y ceftazidima y el cálculo de la correspondiente recta de regresión se realizó con el programa de estadística PRESTA (versión 2.2, FIS, 1991).



## **IV.- RESULTADOS**

---

# 1.- INCIDENCIA Y EVOLUCION DE LA SENSIBILIDAD-RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS EN *Enterobacteriaceae* (1987-1992).

La incidencia de aislamientos resistentes durante el período 1987-1992 de 11 especies de *Enterobacteriaceae* frente a 8 antibióticos  $\beta$ -lactámicos, de acuerdo con los puntos críticos de resistencia establecidos queda reflejada en la TABLA 9. La evolución de la sensibilidad, por especie, durante este sexenio se recoge en las TABLAS 10-20, resaltándose en las FIGURAS 1-3 algunos de los aspectos más sobresalientes.

**TABLA 9.-** Incidencia de aislamientos resistentes (%) a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacteriaceae* en el Hospital Ramón y Cajal (1987-1992).

Microorganismo	Nº	AMP	TIC	AMC	KFZ		CXM	FOX		CTX			CAZ	
		216 <sup>a</sup>	232	216/8	28	216	216	28	216	21	22	24	21	22
<i>E. coli</i>	14.234	56,2	55,6	24,6	13,6	.	2,2	4,2	.	1,6	.	.	1,6	.
<i>Salmonella spp.</i>	959	19,6	18,9	8,2	3,9	.	2,0	0,6	.	2,6	.	.	3,1	.
<i>P. mirabilis</i>	2.634	36,9	24,9	7,3	.	12,4	2,1	.	0,9	0,3	.	.	1,0	.
<i>K. pneumoniae</i>	1.674	98,0	97,7	10,3	.	10,1	5,4	.	2,7	3,4	.	.	4,3	.
<i>K. oxytoca</i>	693	98,2	97,5	13,5	.	37,8	10,7	.	1,5	2,2	.	.	2,2	.
<i>P. vulgaris</i>	240	97,2	45,4	14,6	.	95,4	90,0	.	3,3	14,1	.	.	3,4	.
<i>E. cloacae</i>	1.380	89,2	24,9	93,4	.	96,1	37,5	.	94,7	.	21,9	.	.	19,5
<i>E. aerogenes</i>	254	92,8	56,0	90,7	.	90,4	53,5	.	94,1	.	35,9	.	.	43,3
<i>C. freundii</i>	520	81,8	35,4	83,1	.	90,0	27,7	.	90,2	.	26,1	.	.	21,2
<i>M. morganii</i>	595	98,3	16,8	95,9	.	98,4	87,4	.	22,5	.	18,4	.	.	17,7
<i>S. marcescens</i>	1.060	98,6	37,1	98,7	.	99,7	98,6	.	85,2	.	.	22,5	.	10,8

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

<sup>a</sup>: puntos críticos de resistencia ( $\mu\text{g/ml}$ ).

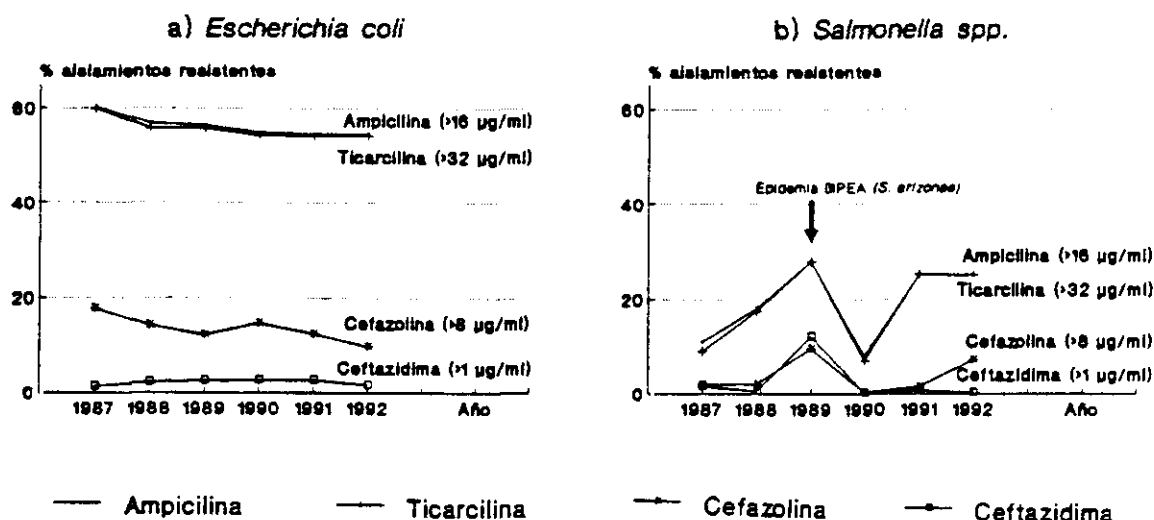
### 1.1.- *Escherichia coli*.

El 56,2% de los 14.234 aislamientos de *E. coli* estudiados en nuestro hospital desde 1987 hasta 1992 fueron resistentes a la ampicilina, el 55,6% lo fueron a la ticarcilina y el 13,6% a la cefazolina. Por el contrario, menos del 2% fueron resistentes a la cefotaxima y la ceftazidima (TABLA 9).

Durante estos años, se observó una disminución progresiva del número de aislamientos resistentes a la ampicilina ( $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ): 60,2% en 1987 y 54,3% en 1992 ( $p < 0,001$ ). En paralelo, es de reseñar el aumento de aislamientos inhibidos por una concentración de ampicilina de  $2 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,001$ ). Este hecho también se constató al analizar la distribución en las diferentes concentraciones de la asociación amoxicilina/ácido clavulánico: en  $8/4 \mu\text{g/ml}$  aumentó significativamente el número de aislamientos ( $p < 0,001$ ) desde el 25,7% en 1987 al 34,5% en 1992 y disminuyeron aquellos con una CMI superior a  $16/8 \mu\text{g/ml}$ , 7,3% en 1988 y 4,1% en 1992 ( $p < 0,01$ ). El descenso del número de microorganismos resistentes fue más significativo ( $p < 0,001$ ) cuando se consideraron CMI superiores o iguales a  $16/8 \mu\text{g/ml}$ , 31,5% en 1987 frente a un 18,0% en 1992. Con respecto a la ticarcilina también se observó una disminución del número de aislamientos resistentes ( $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ): 59,9% en 1987 y 54,2% en 1992 ( $p < 0,001$ ) (FIGURA 1).

Los valores obtenidos para la cefazolina ( $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ) indicaron, asimismo, una reducción de la resistencia: 17,8% en 1987 frente a un 9,8% en 1992 ( $p < 0,001$ ). Nuevamente, en concentraciones intermedias, 1 y  $2 \mu\text{g/ml}$ , se elevó el porcentaje de aislamientos inhibidos, 36,2% y 23,9% en 1987 y 45,6% y 29,1% en 1992. Frente a la cefuroxima, aumentó también el número de microorganismos inhibidos por una concentración crítica intermedia ( $2 \mu\text{g/ml}$ ), 44,5% en 1987 y 64,1% en 1992 ( $p < 0,001$ ). Para valores de CMI más altos ( $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) no existieron modificaciones. El aumento del número de aislamientos inhibidos por  $2 \mu\text{g/ml}$  de cefoxitina fue paralelo al que se produjo con  $2 \mu\text{g/ml}$  de cefuroxima. La media de aislamientos resistentes a la cefoxitina ( $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ) fue del 4,2%, máximo del 5,9% en 1990 y mínimo del 3,6% en 1992.

La incidencia de resistencia a la cefotaxima y ceftazidima fue, en general, baja y no se modificó sustancialmente durante el período de estudio. Para cefotaxima el porcentaje de aislamientos inhibidos por una concentración superior a  $2 \mu\text{g/ml}$  fue inferior al 1% en todos los años, no incrementándose de forma significativa al considerar una concentración de 0,5 y  $1 \mu\text{g/ml}$ , 2,0% y 1,6%, respectivamente (TABLA 21). El porcentaje de aislamientos con CMI superior o igual a  $1 \mu\text{g/ml}$  de ceftazidima fue del 2,2% con un valor máximo del 2,6% durante 1989 y 1990.

**FIGURA 1.-** Evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

### 1.2.- *Salmonella spp.*

La tasa de resistencia a la ampicilina (19,6%) fue sensiblemente inferior a la observada en *E. coli* (56,2%). Además en *Salmonella spp.* la resistencia a la ampicilina aumentó a lo largo del período de estudio desde el 11,1% en 1987 al 25% en 1992 ( $p < 0,001$ ) con un mínimo del 8,2% en 1990 y un máximo del 27,9% en 1989. Una epidemia por *Salmonella arizonae* productora de BIPEA ocurrida en 1989 elevó la tasa de resistencia a la ampicilina y el resto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos: ticarcilina, 27,9%, frente a una media en el sexenio del 18,8%; cefazolina, 9,6%, media 3,9%; cefuroxima, 3,1%, media 2,0%; y en particular la ceftazidima, 12,2%, media 3,1% (FIGURA 1). Por otra parte, las modificaciones que se observaron en *E. coli* al considerar concentraciones intermedias de antibiótico sólo se manifestaron en *Salmonella* para la cefoxitina (2 µg/ml) ( $p < 0,001$ ).

### 1.3.- *Proteus mirabilis*.

La tasa de resistencia a la ampicilina en esta especie (36,9%) ocupó un lugar intermedio entre la observada en *E. coli* y en *Salmonella spp.* (TABLA 9). Se evidenció una estabilidad de los valores de sensibilidad para la ampicilina y amoxicilina/clavulánico a lo largo del sexenio, si bien, se observó una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) de la resistencia a la cefazolina de más del 10%. Es de destacar, que en el año 1987 se obtuvieron las cifras máximas de resistencia a la cefazolina (19,1%), cefuroxima (4,3%), cefoxitina (1,8%) y ceftazidima (1,2%).

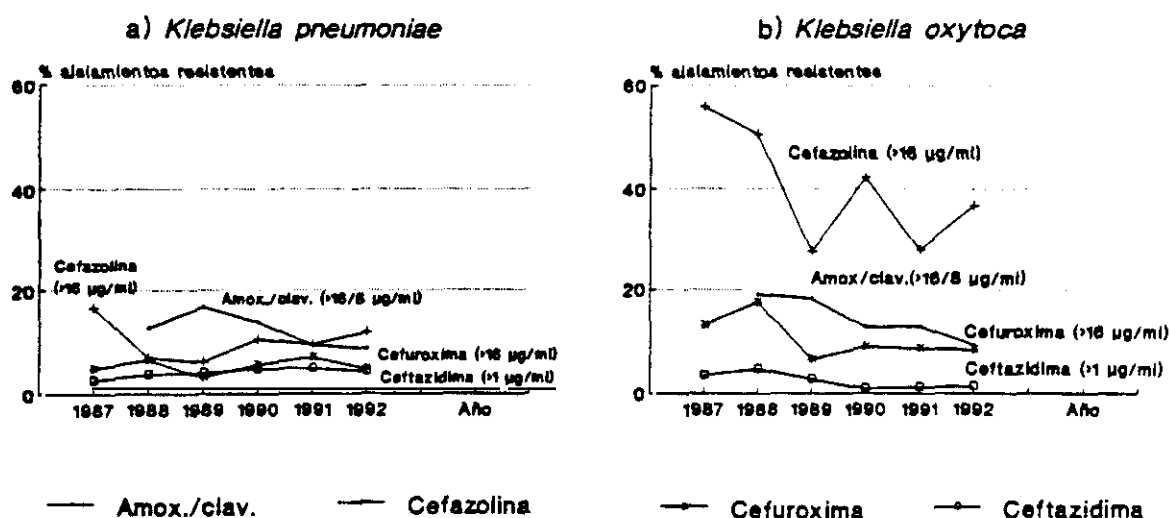
#### 1.4.- *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

En ambas especies, la resistencia a la ampicilina y la ticarcilina fue cercana al 100%, siendo los aislamientos de *K. oxytoca* significativamente más resistentes ( $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) a la cefazolina (37,8%) y la cefuroxima (10,7%) que los de *K. pneumoniae* (10,1 y 5,4%, respectivamente) (FIGURA 2). Con independencia de este hecho se redujo el número de microorganismos con resistencia a la cefazolina: 16,7% en 1987 y 11,9% en 1992 ( $p < 0,05$ ) para *K. pneumoniae* y 55,9% en 1987 y 36,8% en 1992 ( $p < 0,01$ ) para *K. oxytoca*. Asimismo, en *K. oxytoca* disminuyó el número de aislamientos resistentes a la amoxicilina/clavulánico: 19,2 % en 1988 y 9,3% en 1992 ( $p < 0,01$ ).

En este género y al igual que en *E. coli* se produjo una elevación del número de aislamientos inhibidos por concentraciones críticas intermedias. En *K. pneumoniae*, si consideramos  $1 \mu\text{g/ml}$  de cefazolina,  $2 \mu\text{g/ml}$  de cefuroxima y  $2 \mu\text{g/ml}$  de cefoxitina se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del 13,3%, 11,2% y 5,4%, respectivamente. Asimismo, en *K. oxytoca* a una concentración crítica de  $2 \mu\text{g/ml}$  de cefazolina, cefuroxima y cefoxitina el aumento fue del 11,1%, 11,2% y 5,4%, respectivamente.

Es de resaltar que, aún sin significación estadística, el número de aislamientos con menor sensibilidad a la cefotaxima ( $> 2 \mu\text{g/ml}$ ) y ceftazidima ( $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ ) en *K. pneumoniae* fue mayor en 1992 que en 1987. Por el contrario, la sensibilidad a la cefotaxima y ceftazidima en *K. oxytoca* se mantuvo con pocas variaciones a lo largo del período de estudio.

FIGURA 2.- Evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Klebsiella*.



### 1.5.- *Proteus vulgaris*.

El bajo número de aislamientos por año con respecto a otras especies de *Enterobacteriaceae* impidió apreciaciones muy precisas en la evolución de la sensibilidad y la constatación de patrones de resistencia uniformes a lo largo del período estudiado. No obstante, es de resaltar el alto número de aislamientos con resistencia a la cefuroxima (> 90%) y el mayor porcentaje de cepas resistentes a la cefotaxima con respecto a la ceftazidima, siendo estas más numerosas en 1988 y en 1990. Asimismo, en estos mismo años se alcanzó el mayor porcentaje de cepas con resistencia a la asociación de amoxicilina/ácido clavulánico: 20,0% en 1988 y 18,9% en 1990.

### 1.6.- *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*.

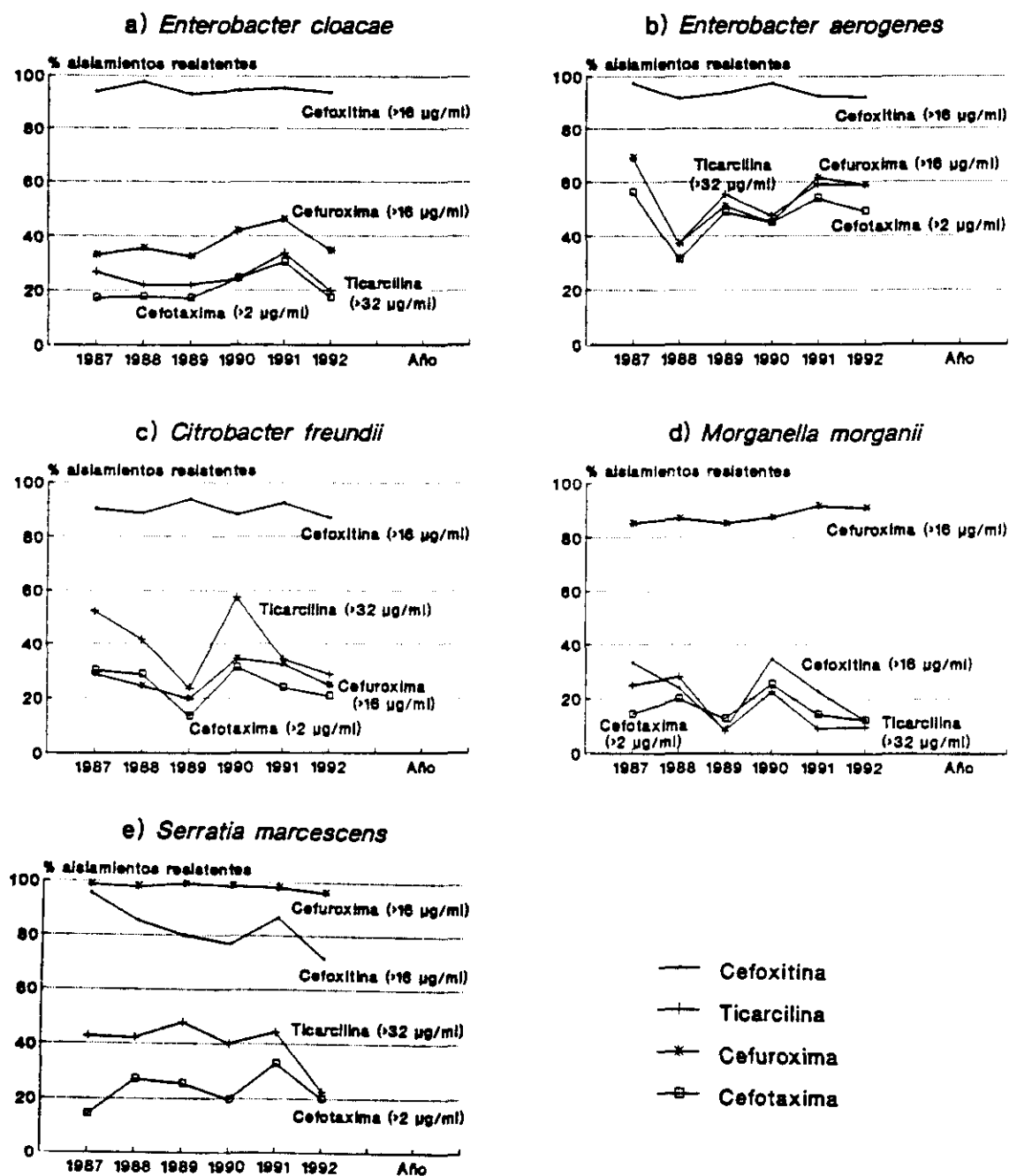
La resistencia a la ampicilina, amoxicilina/clavulánico y cefazolina en *E. cloacae* no sufrió modificaciones importantes con valores medios del 89,2% (rango 87,6-92,1%), 93,4% (91,3-94,8%) y 96,1% (94,3-97,6%), respectivamente. Frente a la ticarcilina, media 24,9%, y cefuroxima, media 37,5%, se obtuvieron cifras máximas de resistencia en el año 1991, 33,7% y 46,1%, respectivamente. Asimismo, en 1991 la resistencia a la cefotaxima (> 2 µg/ml, 30,5%) y ceftazidima (≥ 2 µg/ml, 29,1%) alcanzaron los valores más altos. Por el contrario, las cifras mínimas de resistencia estuvieron marcadas por el inicio y el final del período (FIGURA 3).

En *E. aerogenes* los valores medios de resistencia fueron mayores que los obtenidos en *E. cloacae*: ticarcilina, 56,0%; cefotaxima, 35,9% y ceftazidima, 43,3% (TABLA 9 y FIGURA 3). El mayor número de aislamientos resistentes a estos tres antibióticos se obtuvo en 1987, detectándose también éste mismo año el máximo porcentaje de resistencia a la cefuroxima (69,2%) (FIGURA 3).

### 1.7.- *Citrobacter freundii*.

Más del 20% de los aislamientos de *C. freundii* fueron resistentes a la cefotaxima y ceftazidima (TABLA 9), obteniéndose las cifras máximas en el año 1990 (FIGURA 3). En 1992 se observó una tasa de resistencia inferior a la de 1987 ( $p < 0,001$ ): 28,6% frente a un 52,3% para la ticarcilina; 20,8% frente a un 30,1% para la cefotaxima (> 2 µg/ml) y 26,6% frente a un 42,8% para la ceftazidima (≥ 1 µg/ml). La cefuroxima siguió una trayectoria similar con un máximo de resistencia en 1990 (34,5%) y un mínimo en 1992 (24,2%).

**FIGURA 3.-** Evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens*.



### 1.8.- *Morganella morganii*.

La práctica totalidad de los aislamientos de *M. morganii* fueron resistentes a la ampicilina, amoxicilina/clavulánico y cefazolina, con una resistencia media para la cefotaxima y ceftazidima ( $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ) del 18,4% y 17,7%, respectivamente.

El año 1990, al igual que en *C. freundii*, marca un punto de inflexión en cuanto a la resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Tras una disminución del número de aislamientos con valores de CMI superiores a  $2 \mu\text{g/ml}$  de cefotaxima y mayores o iguales a  $1 \mu\text{g/ml}$  de ceftazidima en los años 1988 y 1989 respecto a 1987, se alcanzaron cifras máximas en 1990, 25,3% (cefotaxima) y 32,9% (ceftazidima). En 1991 se produjo una disminución de la resistencia a ambos antibióticos, tendencia confirmada en 1992. Es de resaltar que en este último año las cifras obtenidas, 12,4% para cefotaxima y 15,9% para ceftazidima, marcaron el mínimo del sexenio (FIGURA 3). Este mismo hecho se observó con la ticarcilina, obteniéndose las cifras máximas de sensibilidad en 1992, 90,2% ( $p < 0,01$ ).

### 1.9.- *Serratia marcescens*.

La resistencia media a la ampicilina, amoxicilina/clavulánico, cefazolina y cefuroxima fue superior al 95%, observándose más de un 20% de aislamientos con resistencia a la cefotaxima. El año 1992 marcó el mínimo de resistencia, con diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en relación a los valores obtenidos en 1987: ticarcilina, 22,6% en 1992 frente a un 42,8% en 1987 y cefoxitina, 71,6% frente a un 95,7%. Estas diferencias fueron menores al analizar la resistencia a la cefotaxima y ceftazidima.



TABLA 10.- *Escherichia coli*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>E. coli</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	2.096	9,5	21,6	7,5	1,2	0,8	59,4
1988	2.598	4,6	25,6	11,2	1,6	0,4	56,6
1989	2.618	5,9	28,6	8,6	0,5	0,3	56,1
1990	2.021	4,9	29,3	10,6	0,3	0,2	54,7
1991	2.379	9,2	30,4	5,3	0,5	0,2	54,4
1992	2.522	4,6	31,0	8,7	1,1	0,3	54,3
TOTAL	14.234	6,4	27,8	8,7	0,9	0,3	55,9
% acumulado		6,4	34,2	42,9	43,8	44,1	100

<i>E. coli</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	1.246	42,8	25,7	24,2	7,3
1989	1.481	45,0	23,1	24,0	7,9
1990	2.021	49,5	27,0	18,3	5,2
1991	2.379	48,4	27,3	20,4	3,9
1992	2.522	47,5	34,5	13,9	4,1
TOTAL	9.649	47,1	28,3	19,3	5,3
% acumulado		47,1	75,4	94,7	100

<i>E. coli</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	2.096	39,2	0,9	1,3	0,6	58,0
1988	2.598	42,6	1,5	0,7	0,7	54,5
1989	2.618	43,4	0,7	0,2	0,1	55,6
1990	2.021	45,1	0,5	0,2	0,4	53,8
1991	2.379	45,3	0,5	0,2	0,2	53,8
1992	2.522	45,4	0,4	0,2	0,3	53,7
TOTAL	14.234	43,6	0,8	0,4	0,3	54,9
% acumulado		43,6	44,4	44,8	45,1	100

<i>E. coli</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	2.096	8,2	36,2	23,9	13,9	7,1	4,1	6,6
1988	2.598	2,3	44,3	24,8	14,2	6,8	3,7	3,9
1989	2.618	4,5	42,3	27,5	13,5	6,2	2,4	3,6
1990	2.021	2,6	41,3	26,4	14,8	7,4	2,6	4,9
1991	2.379	2,4	40,9	29,9	14,2	6,1	2,4	4,1
1992	2.522	3,4	45,6	29,1	12,1	4,7	1,8	3,3
TOTAL	14.234	3,8	42,0	26,9	13,7	6,4	2,9	4,3
% acumulado		3,8	45,8	72,7	86,4	92,8	95,7	100

TABLA 10.- *Escherichia coli* (continuación).

<i>E. coli</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	2.096	32,8	44,5	15,9	3,4	1,3	2,1
1988	2.598	16,5	51,9	24,6	4,4	1,2	1,4
1989	2.618	26,1	56,7	13,6	2,2	0,7	0,7
1990	2.021	19,5	54,6	19,2	4,6	1,4	0,7
1991	2.379	14,2	60,4	19,7	3,3	1,0	1,4
1992	2.522	12,9	64,1	17,6	3,7	0,6	1,1
TOTAL	14.234	20,1	55,7	18,5	3,5	1,0	1,2
% acumulado		20,1	75,8	94,3	97,8	98,8	100

<i>E. coli</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	2.096	21,2	60,4	13,6	2,5	1,0	1,3
1988	2.598	11,7	65,1	18,5	3,0	1,1	0,6
1989	2.618	18,5	68,5	10,6	1,9	0,1	0,4
1990	2.021	8,9	67,1	18,1	4,3	0,9	0,7
1991	2.379	5,6	73,2	16,8	2,6	0,5	1,3
1992	2.522	5,9	75,2	15,3	2,0	0,9	0,7
TOTAL	14.234	11,9	68,5	15,4	2,7	0,7	0,8
% acumulado		11,9	80,4	95,8	98,5	99,2	100

<i>E. coli</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	1.645	99,2	0,6	0,2	-	-	-
1988	2.598	99,5	0,2	0,1	-	0,03	0,07
1989	2.556	99,6	0,2	0,03	0,1	0,03	0,03
1990	2.021	99,7	0,2	0,1	-	-	-
1991	2.379	99,6	0,3	0,08	0,04	-	-
1992	2.522	99,8	0,1	0,08	0,04	-	-
TOTAL	13.721	99,6	0,2	0,1	0,04	0,02	0,04
% acumulado		99,6	99,8	99,9	99,9	99,9	100

<i>E. coli</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16 $>16$
1987	675	98,7	1,0	---	0,3	---	-
1988	2.598	97,8	1,0	---	0,9	---	0,3
1989	2.618	97,3	1,9	---	0,6	---	0,1 0,03
1990	2.021	97,4	1,4	---	0,9	---	0,2 0,1
1991	2.379	97,5	1,3	---	1,0	---	0,2 0,04
1992	2.522	98,5	0,7	---	0,7	---	0,1 0,04
TOTAL	12.813	97,8	1,2	---	0,8	---	0,1 0,04
% acumulado		97,8	99,0		99,8		99,9 100

TABLA 11.- *Salmonella* spp.: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>Salmonella</i> spp.		AMPICILINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	208	76,9	10,1	1,9	-	0,5	10,6
1988	182	74,2	7,2	0,5	-	-	18,1
1989	197	70,1	2,0	-	-	-	27,9
1990	98	80,6	11,2	-	-	-	8,2
1991	147	71,4	2,0	0,7	0,7	-	25,2
1992	127	58,9	16,1	-	-	-	25,0
TOTAL	959	72,2	7,5	0,6	0,1	0,1	19,5
% acumulado		72,2	79,7	80,3	80,4	80,5	100

<i>Salmonella</i> spp.		AMOXICILINA/CLAVULAN.		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	---	---	---	---	---
1989	139	77,9	9,3	2,0	10,8
1990	98	92,8	5,1	2,1	-
1991	147	82,2	8,9	8,2	0,7
1992	127	81,6	10,5	7,1	0,8
TOTAL	511	83,2	8,6	5,1	3,1
% acumulado		83,2	91,8	93,9	100

<i>Salmonella</i> spp.		TICARCILINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	208	90,4	0,5	-	-	9,1
1988	182	79,7	2,8	-	-	17,5
1989	197	72,1	-	-	0,5	27,4
1990	98	91,8	1,1	-	-	7,1
1991	147	74,8	-	-	-	25,2
1992	127	75,0	-	-	-	25,0
TOTAL	959	80,4	0,7	-	0,1	18,8
% acumulado		80,4	81,1	81,1	81,2	100

<i>Salmonella</i> spp.		CEFAZOLINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	$>16$
1987	208	1,4	66,9	26,9	2,9	-	1,9
1988	182	9,9	67,1	18,7	2,2	0,5	1,6
1989	197	10,4	41,9	33,6	4,5	0,5	8,6
1990	98	3,1	87,7	7,1	2,1	-	-
1991	147	0,7	67,3	24,5	6,1	0,7	0,7
1992	127	1,6	66,2	20,2	4,8	4,0	2,4
TOTAL	959	4,9	63,9	23,5	3,8	0,8	2,9
% acumulado		4,9	68,8	92,3	96,1	96,9	97,1

TABLA 11.- *Salmonella* spp. (continuación).

<i>Salmonella</i> spp.		CEFUROXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	≤1	2	4	8	16	>16
1987	208	---	33,2	55,8	8,2	2,8	-
1988	182	1,1	31,9	57,7	8,2	1,1	-
1989	197	9,1	29,9	43,2	14,7	3,1	-
1990	98	7,1	58,2	32,6	2,1	-	-
1991	147	3,4	42,9	42,9	8,8	2,0	-
1992	127	-	42,8	40,3	15,3	1,6	-
<b>TOTAL</b>	<b>959</b>	<b>3,3</b>	<b>37,6</b>	<b>47,2</b>	<b>9,9</b>	<b>2,0</b>	<b>-</b>
% acumulado		3,3	40,9	88,1	98,0	100	

<i>Salmonella</i> spp.		CEFOXITINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	≤1	2	4	8	16	>16
1987	208	43,3	51,5	4,8	0,4	-	-
1988	182	54,9	39,2	5,4	0,5	-	-
1989	197	44,3	49,7	5,5	0,5	-	-
1990	98	20,4	77,4	1,1	1,1	-	-
1991	147	13,6	80,9	4,1	1,4	-	-
1992	127	12,1	83,1	4,8	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>959</b>	<b>34,6</b>	<b>60,2</b>	<b>4,6</b>	<b>0,6</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
% acumulado		34,6	94,8	99,4	100		

<i>Salmonella</i> spp.		CEFOTAXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	≤2	4	8	16	32	>32
1987	208	100,0	-	-	-	-	-
1988	182	100,0	-	-	-	-	-
1989	197	90,4	6,6	3,0	-	-	-
1990	98	100,0	-	-	-	-	-
1991	147	99,3	-	0,7	-	-	-
1992	127	100,0	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>959</b>	<b>97,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,7</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
% acumulado		97,9	99,3	100			

<i>Salmonella</i> spp.		CEFTAZIDIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	≤0,5	1	---	4	---	16 >16
1987	61	98,4	1,6	---	-	---	-
1988	182	99,4	0,6	---	-	---	-
1989	197	87,8	-	---	-	---	12,2
1990	98	100,0	-	---	-	---	-
1991	147	97,9	1,4	---	-	---	0,7
1992	127	100,0	-	---	-	---	-
<b>TOTAL</b>	<b>812</b>	<b>96,4</b>	<b>0,5</b>	<b>---</b>	<b>-</b>	<b>---</b>	<b>3,1</b>
% acumulado		96,4	96,9		96,9		96,9 100

TABLA 12.- *Proteus mirabilis*: % de aislamientos sensibles por concentración antibiótico.

<i>P. mirabilis</i>		AMPICILINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	393	57,1	4,6	1,8	0,7	0,2	35,6
1988	498	54,6	8,4	0,8	0,4	1,2	34,6
1989	457	58,4	3,5	-	0,7	0,4	37,0
1990	384	58,3	4,7	0,5	-	1,3	35,2
1991	447	60,2	2,0	0,4	-	1,1	36,3
1992	455	51,9	9,2	0,5	0,2	0,5	37,7
TOTAL	2.634	56,7	5,5	0,6	0,3	0,8	36,1
% acumulado		56,7	62,2	62,8	63,1	63,9	100

<i>P. mirabilis</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$	
1987	---	---	---	---	---	
1988	194	82,4	8,4	4,6	4,6	
1989	457	85,7	7,2	4,9	2,2	
1990	384	87,8	4,2	4,4	3,6	
1991	447	85,4	7,2	3,6	3,8	
1992	455	85,3	8,7	3,7	2,3	
TOTAL	1.937	85,6	7,1	4,2	3,1	
% acumulado		85,6	92,7	96,9	100	

<i>P. mirabilis</i>		TICARCILINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$	
1987	393	66,2	5,6	4,3	4,6	19,3	
1988	498	70,1	5,6	4,2	4,4	15,7	
1989	457	67,1	7,4	6,5	6,1	12,9	
1990	384	70,0	6,8	4,9	5,5	12,8	
1991	447	69,6	5,8	4,7	4,5	15,4	
1992	455	68,3	8,0	5,3	4,6	13,8	
TOTAL	2.634	68,6	6,5	5,0	4,9	15,0	
% acumulado		68,6	75,1	80,1	85,0	100	

<i>P. mirabilis</i>		CEFAZOLINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	393	0,2	1,3	33,3	40,5	5,6	4,3	14,8
1988	498	-	0,8	43,5	35,5	7,4	3,8	9,0
1989	457	-	0,9	52,0	27,1	9,2	3,5	7,3
1990	384	0,2	1,8	51,6	25,9	7,5	3,1	9,9
1991	447	-	1,6	52,1	29,3	5,6	2,5	8,9
1992	455	0,5	1,8	50,8	30,6	7,8	1,1	7,4
TOTAL	2.634	0,2	1,3	47,3	31,5	7,3	3,0	9,4
% acumulado		0,2	1,5	48,8	80,3	87,6	90,6	100

TABLA 12.- *Proteus mirabilis* (continuación).

<i>P. mirabilis</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	393	85,8	8,4	1,5	-	0,8	3,5
1988	498	83,4	12,4	1,8	0,4	-	2,0
1989	457	90,4	7,6	0,9	0,2	-	0,9
1990	384	85,4	12,5	0,5	-	0,5	1,1
1991	447	82,8	11,9	2,0	0,2	0,7	2,4
1992	455	88,2	8,1	1,4	0,7	-	1,6
TOTAL	2.634	86,0	10,2	1,4	0,3	0,3	1,8
% acumulado		86,0	96,2	97,6	97,9	98,2	100

<i>P. mirabilis</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	393	2,0	72,6	21,1	2,5	0,5	1,3
1988	498	0,4	74,7	21,7	2,8	0,4	-
1989	457	2,6	78,1	17,1	1,3	0,9	-
1990	384	1,6	76,1	19,0	2,8	0,5	-
1991	447	0,2	74,4	22,0	2,4	0,6	0,4
1992	455	1,2	66,0	29,6	2,5	0,5	0,2
TOTAL	2.634	1,3	73,6	21,8	2,4	0,6	0,3
% acumulado		1,3	74,9	96,7	99,1	99,7	100

<i>P. mirabilis</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	355	99,8	0,2	-	-	-	-
1988	498	99,8	0,2	-	-	-	-
1989	457	99,6	0,4	-	-	-	-
1990	384	97,7	0,3	-	-	-	-
1991	447	99,8	0,2	-	-	-	-
1992	455	99,8	0,2	-	-	-	-
TOTAL	2.596	99,8	0,2	-	-	-	-
% acumulado		99,8	100				

<i>P. mirabilis</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16	$>16$
1987	81	98,8	1,2	---	-	---	-	-
1988	498	99,2	0,4	---	0,4	---	-	-
1989	457	99,0	0,8	---	0,2	---	-	-
1990	384	99,0	0,5	---	0,5	---	-	-
1991	447	99,0	0,4	---	0,6	---	-	-
1992	455	99,2	0,6	---	0,2	---	-	-
TOTAL	2.322	99,0	0,6	---	0,4	---	-	-
% acumulado		99,0	99,6		100			

TABLA 13.- *Klebsiella pneumoniae*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>K. pneumoniae</i>		AMPICILINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	228	1,7	-	0,4	0,9	2,2	94,8
1988	258	0,4	2,3	-	1,5	9,0	86,8
1989	292	1,3	-	-	0,3	1,4	97,0
1990	269	-	-	1,5	-	1,5	97,0
1991	325	0,6	-	-	0,9	4,0	94,5
1992	302	-	-	-	1,1	3,8	95,1
TOTAL	1.674	0,6	0,3	0,3	0,8	3,6	94,4
% acumulado		0,6	0,9	1,2	2,0	5,6	100

<i>K. pneumoniae</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$	
1987	---	---	---	---	---	
1988	113	77,8	9,5	7,9	4,8	
1989	275	70,8	13,4	10,3	5,5	
1990	269	76,2	10,0	8,2	5,6	
1991	325	81,5	9,2	3,4	5,9	
1992	302	77,5	14,0	5,3	3,2	
TOTAL	1.284	78,2	11,5	6,1	4,2	
% acumulado		77,6	89,1	95,8	100	

<i>K. pneumoniae</i>		TICARCILINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$	
1987	228	4,4	-	3,1	4,8	87,7	
1988	258	4,7	1,6	7,0	7,3	79,4	
1989	292	2,1	-	1,0	5,1	91,8	
1990	269	0,4	0,4	2,9	3,7	92,6	
1991	325	0,6	0,3	4,0	7,4	87,7	
1992	302	-	0,3	1,8	5,6	92,3	
TOTAL	1.674	1,9	0,4	3,2	5,7	88,8	
% acumulado		1,9	2,3	5,5	11,2	100	

<i>K. pneumoniae</i>		CEFAZOLINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	228	3,1	47,4	15,8	10,9	6,1	5,7	11,0
1988	258	1,5	65,1	13,2	8,5	4,7	1,2	5,8
1989	292	2,1	57,6	17,1	12,3	4,8	1,0	5,1
1990	269	3,3	52,9	18,2	8,9	6,3	3,3	7,1
1991	325	2,1	57,9	24,0	5,0	1,5	1,2	8,3
1992	302	1,4	60,7	15,6	6,6	3,8	1,7	10,2
TOTAL	1.674	2,2	57,2	17,6	8,5	4,4	2,2	7,9
% acumulado		2,2	59,4	77,0	85,5	89,9	92,1	100

TABLA 13.- *Klebsiella pneumoniae* (continuación).

<i>K. pneumoniae</i>		CEFUROXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	228	38,6	36,9	13,6	6,1	1,3	3,5
1988	258	42,7	34,9	11,6	4,2	3,5	3,1
1989	292	46,6	41,1	6,5	2,7	0,7	2,4
1990	269	42,4	40,5	8,6	3,0	1,1	4,4
1991	325	44,0	39,7	5,6	3,7	1,8	5,2
1992	302	36,1	48,1	7,4	3,5	0,3	4,6
TOTAL	1.674	41,8	40,4	8,3	4,1	1,4	4,0
% acumulado		41,8	82,2	90,5	94,6	96,0	100

<i>K. pneumoniae</i>		CEFOXITINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	228	17,4	59,3	15,8	4,0	3,1	0,4
1988	258	14,7	56,7	19,0	5,0	1,5	3,1
1989	292	12,0	67,5	15,4	3,1	1,3	0,7
1990	269	18,6	58,5	14,5	4,4	1,5	2,6
1991	325	11,7	64,6	14,8	5,6	1,5	1,8
1992	302	19,5	64,7	12,3	2,3	0,6	0,6
TOTAL	1.674	15,5	62,3	15,5	4,0	1,4	1,3
% acumulado		15,5	77,8	93,2	97,2	98,6	100

<i>K. pneumoniae</i>		CEFOTAXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	178	97,8	1,1	1,1	-	-	-
1988	197	98,0	1,0	1,0	-	-	-
1989	292	99,0	0,3	-	-	-	0,3
1990	269	96,4	1,2	0,7	0,3	0,3	1,1
1991	325	96,7	0,9	0,6	-	0,6	1,2
1992	302	96,5	-	0,3	-	0,6	2,6
TOTAL	1.563	97,3	0,7	0,6	0,1	0,3	1,0
% acumulado		97,3	98,0	98,6	98,7	99,0	100

<i>K. pneumoniae</i>		CEFTAZIDIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16 $>16$
1987	86	97,4	1,2	---	1,4	---	-
1988	258	96,2	2,7	---	1,1	---	-
1989	292	96,0	2,7	---	0,7	---	0,3
1990	269	95,3	1,1	---	1,5	---	0,3
1991	325	95,1	2,5	---	0,6	---	0,3
1992	302	95,7	1,0	---	1,0	---	0,3
TOTAL	1.532	95,7	2,0	---	1,0	---	0,2
% acumulado		95,7	97,7		98,7		99,8 100



TABLA 14.- *Klebsiella oxytoca*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>K. oxytoca</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	84	-	-	1,2	-	3,6	95,2
1988	85	-	-	-	-	-	100,0
1989	109	-	-	-	2,7	3,6	93,7
1990	102	-	-	-	1,9	-	98,1
1991	161	1,2	-	-	1,2	6,8	90,8
1992	152	-	0,7	-	0,7	4,9	93,7
TOTAL	693	0,3	0,2	0,2	1,1	3,6	94,6
% acumulado		0,3	0,5	0,7	8,8	12,4	100

<i>K. oxytoca</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	33	69,2	11,6	3,9	15,3
1989	109	65,2	16,5	10,1	8,2
1990	102	82,3	5,9	8,9	2,9
1991	161	82,0	5,0	5,0	8,0
1992	152	84,1	5,6	4,7	5,6
TOTAL	557	78,6	7,9	6,5	7,0
% acumulado		78,6	86,5	93,0	100

<i>K. oxytoca</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	84	3,5	2,4	8,3	20,2	65,6
1988	85	1,2	2,3	5,9	10,6	80,0
1989	109	-	1,8	5,6	13,7	78,9
1990	102	-	0,9	3,9	9,8	85,4
1991	161	1,2	0,6	3,7	15,0	79,5
1992	152	0,7	1,4	2,8	9,0	86,1
TOTAL	693	1,0	1,5	4,6	12,9	80,0
% acumulado		1,0	2,5	7,1	20,0	100

<i>K. oxytoca</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	84	-	11,9	8,3	9,5	14,4	19,0	36,9
1988	85	-	7,0	7,0	15,4	20,0	10,6	40,0
1989	109	0,9	9,2	13,7	27,5	21,1	10,1	17,5
1990	102	-	8,8	16,6	16,6	15,7	14,7	27,6
1991	161	0,6	11,2	24,2	24,2	11,8	4,4	23,6
1992	152	-	9,8	19,4	21,5	12,5	9,0	27,8
TOTAL	693	0,3	9,8	16,3	20,5	15,3	10,4	27,4
% acumulado		0,3	10,1	26,4	46,9	62,2	72,6	100

TABLA 14.- *Klebsiella oxytoca* (continuación).

<i>K. oxytoca</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	84	32,1	33,3	19,1	2,4	-	13,1
1988	85	24,8	36,5	16,4	4,7	-	17,6
1989	109	39,4	42,2	9,2	1,8	0,9	6,5
1990	102	32,4	44,4	12,5	0,9	0,9	8,9
1991	161	42,2	34,2	11,8	2,5	0,6	8,7
1992	152	31,2	37,5	13,9	7,6	1,4	8,4
TOTAL	693	34,5	37,8	13,4	3,6	0,7	10,0
% acumulado		34,5	72,3	85,7	89,3	90,0	100

<i>K. oxytoca</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	84	31,0	55,9	8,3	1,2	3,6	-
1988	85	22,3	64,7	4,7	5,9	2,4	-
1989	109	29,3	62,4	7,3	1,0	-	-
1990	102	20,7	58,8	15,7	2,9	1,9	-
1991	161	28,6	57,8	11,2	1,2	1,2	-
1992	152	24,5	58,6	9,8	5,9	0,6	0,6
TOTAL	693	26,1	59,6	9,8	3,0	1,4	0,1
% acumulado		26,1	85,7	95,5	98,5	99,9	100

<i>K. oxytoca</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	84	98,8	1,2	-	-	-	-
1988	85	96,5	3,5	-	-	-	-
1989	109	100,0	-	-	-	-	-
1990	102	98,2	1,8	-	-	-	-
1991	161	99,4	0,6	-	-	-	-
1992	152	98,7	1,3	-	-	-	-
TOTAL	693	98,7	1,3	-	-	-	-
% acumulado		98,7	100				

<i>K. oxytoca</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16	$>16$
1987	84	96,5	3,5	---	-	---	-	-
1988	85	95,3	3,5	---	1,2	---	-	-
1989	109	97,3	2,7	---	-	---	-	-
1990	102	99,1	0,9	---	-	---	-	-
1991	161	98,8	1,2	---	-	---	-	-
1992	152	98,7	1,3	---	-	---	-	-
TOTAL	693	97,8	2,1	---	0,1	---	-	-
% acumulado		97,8	99,9		100			

TABLA 15.- *Proteus vulgaris*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>P. vulgaris</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	29	-	-	-	-	6,9	93,1
1988	57	5,2	-	-	-	-	94,8
1989	40	2,5	-	-	-	-	97,5
1990	34	2,9	2,9	2,9	-	-	91,3
1991	42	-	-	-	-	-	100,0
1992	38	-	-	-	-	-	100,0
TOTAL	240	2,0	0,4	0,4	-	0,8	96,4
% acumulado		2,0	2,4	2,8	2,8	3,6	100

<i>P. vulgaris</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	17	58,8	23,6	11,7	5,9
1989	40	52,5	27,5	12,5	7,5
1990	34	53,1	38,2	2,9	5,8
1991	42	28,7	52,4	14,2	4,7
1992	38	37,2	51,4	5,7	5,7
TOTAL	171	42,1	41,5	8,8	5,8
% acumulado		42,1	83,6	92,4	100

<i>P. vulgaris</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	29	31,0	17,2	17,2	13,8	20,8
1988	57	38,5	15,8	10,5	15,8	19,4
1989	40	37,5	30,0	17,5	10,0	5,0
1990	34	41,2	11,8	8,8	23,5	14,7
1991	42	38,1	7,2	21,4	11,9	21,4
1992	38	48,6	2,9	8,6	11,4	28,5
TOTAL	240	39,6	15,0	13,3	14,2	17,9
% acumulado		39,6	54,6	67,9	82,1	100

<i>P. vulgaris</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	29	-	-	-	3,4	3,4	3,4	89,8
1988	57	-	-	5,2	-	-	-	94,8
1989	40	-	-	-	2,5	-	-	97,5
1990	34	-	-	2,9	2,9	2,9	2,9	88,4
1991	42	-	-	-	-	-	-	100,0
1992	38	-	-	-	2,9	2,9	8,6	85,6
TOTAL	240	-	-	1,7	1,2	1,2	2,1	93,3
% acumulado				1,7	2,9	4,1	6,3	100

TABLA 15.- *Proteus vulgaris* (continuación).

<i>P. vulgaris</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	29	6,9	-	-	10,3	-	82,8
1988	57	7,0	-	-	-	5,2	87,8
1989	40	2,5	-	-	-	-	97,5
1990	34	11,7	2,9	-	-	-	85,4
1991	42	-	2,4	-	-	-	97,6
1992	38	17,0	2,9	-	2,9	2,9	74,3
<b>TOTAL</b>	<b>240</b>	<b>7,1</b>	<b>1,2</b>	<b>-</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>88,3</b>
<b>% acumulado</b>		<b>7,1</b>	<b>8,3</b>	<b>8,3</b>	<b>10,0</b>	<b>11,7</b>	<b>100</b>

<i>P. vulgaris</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	29	-	41,4	41,4	10,4	3,4	3,4
1988	57	1,7	33,3	49,1	10,5	3,5	1,9
1989	40	-	40,0	57,5	-	2,5	-
1990	34	-	35,3	50,0	14,7	-	-
1991	42	-	21,4	61,9	14,3	2,4	-
1992	38	-	34,3	54,3	11,4	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>240</b>	<b>0,4</b>	<b>33,8</b>	<b>52,9</b>	<b>9,6</b>	<b>2,5</b>	<b>0,8</b>
<b>% acumulado</b>		<b>0,4</b>	<b>34,2</b>	<b>87,1</b>	<b>96,7</b>	<b>99,2</b>	<b>100</b>

<i>P. vulgaris</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	29	96,6	-	-	-	-	3,4
1988	49	75,7	8,1	6,1	2,0	2,0	6,1
1989	40	95,0	2,5	-	-	-	2,5
1990	34	79,4	8,9	-	2,9	2,9	5,9
1991	42	88,1	4,8	-	-	-	7,1
1992	38	97,1	-	2,9	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>232</b>	<b>87,9</b>	<b>4,3</b>	<b>1,7</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>4,3</b>
<b>% acumulado</b>		<b>87,9</b>	<b>92,2</b>	<b>93,9</b>	<b>94,8</b>	<b>95,7</b>	<b>100</b>

<i>P. vulgaris</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16	$>16$
1987	29	96,6	3,4	---	-	---	-	-
1988	21	90,6	4,7	---	-	---	4,7	-
1989	40	95,0	2,5	---	-	---	2,5	-
1990	34	97,1	-	---	2,9	---	-	-
1991	42	100,0	-	---	-	---	-	-
1992	38	100,0	-	---	-	---	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>204</b>	<b>97,1</b>	<b>1,5</b>	<b>---</b>	<b>0,5</b>	<b>---</b>	<b>0,9</b>	<b>-</b>
<b>% acumulado</b>		<b>97,1</b>	<b>98,6</b>		<b>99,1</b>		<b>100</b>	

TABLA 16.- *Enterobacter cloacae*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>E. cloacae</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	209	0,5	1,4	2,4	5,3	9,5	80,9
1988	191	0,5	0,5	2,7	4,2	5,2	86,9
1989	227	0,4	2,2	3,0	6,7	0,8	86,9
1990	193	0,5	2,5	2,6	4,1	8,8	81,5
1991	282	-	2,1	5,3	3,9	7,4	81,3
1992	278	0,4	2,2	4,9	4,9	7,2	80,4
TOTAL	1.380	0,4	1,9	3,7	4,8	6,5	82,7
% acumulado		0,4	2,3	6,0	10,8	17,3	100

<i>E. cloacae</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	47	4,2	2,1	10,7	83,0
1989	227	2,2	3,0	6,7	88,1
1990	193	4,6	4,1	6,3	85,0
1991	282	3,2	3,2	6,4	87,2
1992	278	5,6	0,8	4,5	89,1
TOTAL	1.027	4,0	2,6	6,1	87,3
% acumulado		4,0	6,6	12,7	100

<i>E. cloacae</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	209	69,4	3,9	1,4	1,4	23,9
1988	191	73,8	4,2	2,1	1,1	18,8
1989	227	75,8	2,2	2,2	2,2	17,6
1990	193	69,9	5,7	-	2,6	21,8
1991	282	64,6	1,7	2,5	0,7	30,5
1992	278	76,6	3,7	2,3	2,3	15,1
TOTAL	1.380	71,6	3,5	1,8	1,7	21,4
% acumulado		71,6	75,1	76,9	78,6	100

<i>E. cloacae</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	209	-	0,5	0,9	0,5	1,4	1,9	94,8
1988	191	-	-	0,5	1,1	1,1	1,1	96,2
1989	227	-	1,8	0,9	1,8	0,4	1,3	93,8
1990	193	-	0,5	2,1	1,5	1,5	1,5	92,9
1991	282	-	0,3	1,1	0,7	0,3	1,7	95,9
1992	278	-	0,8	1,5	1,9	1,5	1,1	93,2
TOTAL	1.380	-	0,6	1,2	1,2	0,9	1,5	94,6
% acumulado			0,6	1,8	3,0	3,9	5,4	100

TABLA 16.- *Enterobacter cloacae* (continuación).

<i>E. cloacae</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	209	3,4	8,1	34,9	20,5	4,3	28,8
1988	191	1,6	12,0	28,8	22,0	8,4	27,2
1989	227	3,5	10,1	34,4	19,4	7,5	25,1
1990	193	1,0	9,3	22,8	24,8	10,4	31,7
1991	282	2,8	12,1	24,1	14,9	9,2	36,9
1992	278	2,7	10,9	29,4	22,3	8,3	26,4
TOTAL	1.380	2,6	10,5	29,0	20,4	8,0	29,5
% acumulado		2,6	13,1	42,1	62,5	70,5	100

<i>E. cloacae</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	209	0,9	1,9	1,9	1,4	3,4	90,5
1988	191	-	1,1	-	1,1	2,6	95,2
1989	227	0,8	0,4	4,4	1,3	4,9	88,2
1990	193	-	1,5	3,1	1,0	6,7	87,7
1991	282	-	0,7	1,7	2,1	1,4	94,1
1992	278	0,4	1,5	3,0	1,1	2,3	91,7
TOTAL	1.380	0,4	1,1	2,4	1,4	3,3	91,4
% acumulado		0,4	5,5	7,9	9,3	12,6	100

<i>E. cloacae</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	193	82,9	1,5	2,1	2,1	1,0	10,4
1988	171	82,4	2,3	1,8	1,8	1,8	9,9
1989	227	83,8	3,0	0,8	0,8	2,7	8,9
1990	193	75,6	3,6	1,0	2,6	3,7	13,5
1991	282	69,5	1,4	1,1	2,8	1,1	24,1
1992	278	82,2	2,6	2,3	1,5	1,1	10,3
TOTAL	1.344	78,5	2,4	1,5	1,9	1,9	13,8
% acumulado		78,5	80,9	82,4	84,3	86,2	100

<i>E. cloacae</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$<0,5$	1	---	4	---	$>16$
1987	75	82,7	10,7	---	1,3	---	5,3
1988	191	75,9	6,3	---	4,2	---	11,5
1989	227	81,0	3,5	---	3,1	---	11,1
1990	193	73,1	5,2	---	2,6	---	16,0
1991	282	68,8	2,1	---	2,5	---	24,5
1992	278	81,4	2,8	---	1,1	---	12,1
TOTAL	1,246	76,2	4,3	---	2,5	---	14,9
% acumulado		76,2	80,5		83,0		85,1 100

TABLA 17.- *Enterobacter aerogenes*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>E. aerogenes</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	39	-	-	-	-	10,2	89,8
1988	35	-	5,7	2,8	11,4	14,2	65,9
1989	47	-	2,1	2,1	-	-	95,8
1990	40	2,5	2,5	5,0	-	2,5	87,5
1991	39	-	-	5,1	2,5	2,5	89,9
1992	54	-	1,9	-	1,9	6,0	90,2
TOTAL	254	0,4	2,0	2,4	2,4	5,5	87,3
% acumulado		0,4	2,4	4,8	7,2	12,7	100

<i>E. aerogenes</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	24	8,3	4,2	-	87,5
1989	47	4,2	4,2	-	91,6
1990	40	7,5	-	2,5	90,0
1991	39	5,1	2,5	12,8	79,6
1992	54	9,8	1,9	11,8	76,5
TOTAL	204	6,9	2,4	5,9	84,8
% acumulado		6,9	9,3	15,2	100

<i>E. aerogenes</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	39	30,8	-	5,2	17,9	46,1
1988	35	60,0	2,8	2,8	5,7	28,7
1989	47	42,6	2,1	-	4,2	51,1
1990	40	45,0	7,5	2,5	10,0	35,0
1991	39	38,5	2,5	-	7,7	51,3
1992	54	37,3	3,9	5,9	3,9	49,0
TOTAL	254	40,9	3,1	2,8	7,9	45,3
% acumulado		40,9	44,0	46,8	54,7	100

<i>E. aerogenes</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	39	-	-	-	-	-	5,1	94,9
1988	35	-	8,6	5,7	-	11,4	2,8	71,4
1989	47	-	2,1	2,1	4,3	-	-	91,5
1990	40	-	5,0	-	-	-	2,5	92,5
1991	39	-	-	-	2,5	2,5	-	95,0
1992	54	-	2,1	7,8	3,9	-	1,9	84,3
TOTAL	254	-	2,8	2,8	2,0	2,0	2,0	88,4
% acumulado			2,8	5,6	7,6	9,6	11,6	100

TABLA 17.- *Enterobacter aerogenes* (continuación).

<i>E. aerogenes</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	39	5,2	17,9	5,2	2,5	-	69,2
1988	35	5,7	34,3	22,8	2,8	5,7	28,7
1989	47	4,2	21,2	17,1	6,4	6,4	44,7
1990	40	12,5	15,0	20,0	7,5	-	45,0
1991	39	2,5	30,8	2,5	2,5	7,7	54,0
1992	54	5,9	13,7	13,7	7,8	5,9	53,0
<b>TOTAL</b>	<b>254</b>	<b>5,9</b>	<b>21,7</b>	<b>13,8</b>	<b>5,1</b>	<b>4,3</b>	<b>49,2</b>
<b>% acumulado</b>		<b>5,9</b>	<b>27,6</b>	<b>41,4</b>	<b>46,5</b>	<b>50,8</b>	<b>100</b>

<i>E. aerogenes</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	39	-	-	2,5	-	2,5	95,0
1988	35	-	5,7	-	2,8	2,8	88,7
1989	47	-	-	4,3	2,1	-	93,6
1990	40	-	2,5	-	-	2,5	95,0
1991	39	-	5,0	-	2,5	2,5	90,0
1992	54	-	6,0	1,9	-	1,9	90,2
<b>TOTAL</b>	<b>254</b>	<b>-</b>	<b>3,1</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>2,0</b>	<b>92,1</b>
<b>% acumulado</b>			<b>3,1</b>	<b>4,7</b>	<b>5,9</b>	<b>7,9</b>	<b>100</b>

<i>E. aerogenes</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	39	43,7	2,5	12,8	15,4	17,9	7,7
1988	35	68,6	8,6	2,8	8,6	-	11,4
1989	47	51,2	2,1	8,5	10,6	25,5	2,1
1990	40	55,0	2,5	7,5	15,0	12,5	7,5
1991	39	46,1	2,5	10,3	5,1	18,0	18,0
1992	54	49,1	1,9	11,8	13,7	13,7	9,8
<b>TOTAL</b>	<b>254</b>	<b>52,0</b>	<b>3,1</b>	<b>9,1</b>	<b>11,8</b>	<b>15,0</b>	<b>9,0</b>
<b>% acumulado</b>		<b>52,0</b>	<b>55,1</b>	<b>64,2</b>	<b>76,0</b>	<b>91,0</b>	<b>100</b>

<i>E. aerogenes</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16 $>16$
1987	9	44,5	11,1	---	11,1	---	22,2
1988	35	57,1	20,0	---	-	---	22,9
1989	47	53,2	2,1	---	-	---	36,2
1990	40	52,5	2,5	---	7,5	---	30,0
1991	39	48,8	2,5	---	2,5	---	35,9
1992	54	41,2	7,4	---	7,4	---	31,4
<b>TOTAL</b>	<b>224</b>	<b>50,0</b>	<b>6,7</b>	<b>---</b>	<b>3,6</b>	<b>---</b>	<b>31,7</b>
<b>% acumulado</b>		<b>50,0</b>	<b>56,7</b>		<b>60,3</b>		<b>68,3 100</b>



TABLA 18. *Citrobacter freundii*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>C. freundii</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	63	1,6	4,8	7,9	8,5	10,6	66,6
1988	98	1,0	3,1	4,1	13,3	12,2	66,3
1989	81	1,2	2,5	3,7	6,2	21,0	65,4
1990	93	1,1	3,2	5,4	8,6	12,9	68,8
1991	105	-	1,9	6,7	8,6	12,4	70,4
1992	80	3,9	-	6,5	7,8	13,0	68,8
TOTAL	520	1,3	2,5	5,6	8,8	13,7	68,1
% acumulado		1,3	3,8	9,4	18,2	31,9	100

<i>C. freundii</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	42	2,1	8,4	35,4	54,1
1989	81	2,4	16,0	21,0	60,6
1990	93	10,7	16,1	21,6	51,6
1991	105	5,7	7,6	25,7	61,0
1992	80	5,2	7,8	27,3	59,7
TOTAL	401	5,7	11,2	25,2	57,9
% acumulado		5,7	16,9	42,1	100

<i>C. freundii</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	63	42,9	4,8	1,6	6,3	44,4
1988	98	56,1	2,1	1,0	2,1	38,7
1989	81	75,4	1,2	1,2	-	22,2
1990	93	59,2	4,3	1,1	4,3	31,1
1991	105	61,9	3,8	1,9	2,8	29,6
1992	80	68,8	2,6	-	-	28,6
TOTAL	520	61,5	3,1	1,2	2,5	31,7
% acumulado		61,5	64,6	65,8	68,3	100

<i>C. freundii</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	63	-	3,2	3,2	-	4,8	-	88,8
1988	98	-	1,0	1,0	6,2	3,1	3,1	85,6
1989	81	-	1,2	-	3,7	3,7	2,4	89,0
1990	93	-	-	4,3	4,3	3,2	3,2	85,0
1991	105	-	-	2,8	3,8	0,9	0,9	91,6
1992	80	-	3,9	-	3,9	2,6	-	89,6
TOTAL	520	-	1,4	1,9	3,8	2,9	1,7	88,3
% acumulado			1,4	3,3	7,1	10,0	11,7	100

TABLA 18.- *Citrobacter freundii* (continuación).

<i>C. freundii</i>		CEFUROXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	63	20,6	28,6	17,4	4,8	1,6	27,0
1988	98	7,1	34,8	27,5	6,1	3,1	21,4
1989	81	8,7	53,2	16,0	2,4	1,2	18,5
1990	93	11,8	29,0	20,4	4,3	4,3	30,2
1991	105	6,7	35,2	20,0	5,7	3,8	28,6
1992	80	6,8	44,1	19,6	5,3	-	24,2
TOTAL	520	9,6	37,3	20,6	4,8	2,5	25,2
% acumulado		9,6	46,9	65,7	72,3	74,8	100

<i>C. freundii</i>		CEFOXITINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	63	1,6	3,2	4,8	-	1,6	88,8
1988	98	1,0	4,1	6,1	1,0	2,1	86,7
1989	81	-	3,7	-	1,2	6,2	88,8
1990	93	-	7,5	4,3	-	2,1	86,1
1991	105	-	0,9	4,7	1,9	3,8	88,7
1992	80	3,9	1,3	2,6	5,2	5,2	81,8
TOTAL	520	1,0	3,5	3,8	1,5	3,5	86,7
% acumulado		1,0	4,5	8,3	9,8	13,3	100

<i>C. freundii</i>		CEFOTAXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	63	69,9	7,9	4,8	6,3	7,9	3,2
1988	78	74,4	11,5	1,3	1,3	3,8	7,7
1989	81	86,6	1,2	1,2	2,4	2,4	6,2
1990	93	68,8	4,3	4,3	2,1	9,7	10,8
1991	105	76,3	0,9	1,9	2,8	2,8	15,3
1992	80	79,2	1,3	-	2,6	6,5	10,4
TOTAL	500	75,8	4,2	2,2	2,8	5,4	9,6
% acumulado		75,8	80,0	82,2	85,0	90,4	100

<i>C. freundii</i>		CEFTAZIDIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	$>16$
1987	21	66,8	9,5	---	4,7	---	14,3
1988	98	71,4	10,1	---	3,1	---	14,3
1989	81	81,4	6,2	---	---	---	10,0
1990	93	60,2	11,8	---	5,4	---	21,5
1991	105	71,4	2,9	---	4,7	---	19,1
1992	80	74,0	3,9	---	3,9	---	18,2
TOTAL	478	70,7	7,1	---	4,0	---	16,7
% acumulado		70,7	77,8	---	81,8	---	83,3

TABLA 19.- *Morganella morganii*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>M. morganii</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	96	1,1	-	1,1	2,1	-	95,7
1988	100	-	-	-	2,0	1,0	97,0
1989	95	-	-	-	-	-	100,0
1990	79	-	-	1,3	1,3	-	97,4
1991	109	-	-	-	0,9	-	99,1
1992	116	-	0,9	-	-	1,8	97,3
TOTAL	595	0,2	0,2	0,3	1,0	0,5	97,8
% acumulado		0,2	0,4	0,7	1,7	2,2	100

<i>M. morganii</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	22	-	-	4,5	95,5
1989	95	-	3,1	1,1	95,8
1990	79	8,8	1,3	-	89,9
1991	109	1,9	0,9	-	97,2
1992	116	0,9	1,8	1,8	95,5
TOTAL	421	2,4	1,7	0,9	95,0
% acumulado		2,4	4,1	5,0	100

<i>M. morganii</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	96	66,6	8,3	2,1	7,3	15,6
1988	100	60,0	12,0	8,0	1,0	19,0
1989	95	86,3	5,3	1,1	2,1	5,2
1990	79	65,8	11,4	5,1	5,1	12,6
1991	109	78,9	11,9	4,6	-	4,6
1992	116	80,5	9,7	2,7	0,9	6,2
TOTAL	595	73,5	9,7	3,9	2,5	10,4
% acumulado		73,5	83,2	87,1	89,6	100

<i>M. morganii</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	96	-	-	1,1	3,1	-	-	95,8
1988	100	-	-	-	1,0	-	3,0	96,0
1989	95	-	-	-	-	-	1,1	98,9
1990	79	-	-	1,3	1,3	-	1,3	96,1
1991	109	-	-	-	0,9	0,9	-	98,2
1992	116	-	-	-	-	0,9	0,9	98,2
TOTAL	595	-	-	0,3	1,0	0,3	1,0	97,4
% acumulado				0,3	1,3	1,6	2,6	100

TABLA 19.- *Morganella morganii* (continuación).

<i>M. morganii</i>		CEFUROXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	96	5,2	4,2	3,1	4,2	12,5	70,8
1988	100	4,0	2,0	3,0	4,0	7,0	80,0
1989	95	2,1	1,0	2,1	9,5	22,1	63,2
1990	79	2,5	1,2	1,2	7,6	16,6	70,9
1991	109	1,8	-	1,8	4,5	15,6	76,3
1992	116	1,8	2,7	-	4,4	10,6	80,5
TOTAL	595	3,0	2,2	2,0	5,4	13,3	74,1
% acumulado		3,0	5,2	7,2	12,6	25,9	100

<i>M. morganii</i>		CEFOXITINA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	96	3,1	10,4	10,4	42,7	26,1	7,3
1988	100	-	9,0	5,0	62,0	15,0	9,0
1989	95	1,1	1,1	11,5	77,9	6,3	2,1
1990	79	-	3,8	3,8	56,9	33,0	2,5
1991	109	-	3,7	10,1	66,3	12,5	3,7
1992	116	-	3,5	5,3	78,8	9,7	2,7
TOTAL	595	0,7	5,2	7,6	64,0	16,6	5,9
% acumulado		0,7	5,9	13,5	77,5	94,1	100

<i>M. morganii</i>		CEFOTAXIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	90	85,6	3,4	5,5	1,1	1,1	3,3
1988	90	80,0	5,5	8,8	2,2	-	3,3
1989	95	87,3	8,4	2,1	1,1	-	1,1
1990	79	74,7	5,1	3,8	10,1	2,5	3,8
1991	109	85,5	2,7	6,4	2,7	2,7	-
1992	116	87,6	8,8	1,8	1,8	-	-
TOTAL	579	83,9	5,7	4,7	2,9	1,1	1,7
% acumulado		83,9	89,6	94,3	97,2	98,3	100

<i>M. morganii</i>		CEFTAZIDIMA			CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	$>16$
1987	26	69,2	7,7	---	7,7	---	3,8
1988	100	70,9	8,9	---	8,9	---	2,4
1989	95	82,1	6,3	---	2,1	---	1,1
1990	79	67,1	7,6	---	5,1	---	12,6
1991	109	74,3	5,5	---	3,7	---	3,7
1992	116	84,1	3,5	---	3,5	---	3,5
TOTAL	525	76,0	6,3	---	4,7	---	4,2
% acumulado		76,0	82,3		87,0		95,8 100

TABLA 20.- *Serratia marcescens*: % de aislamientos sensibles por concentración de antibiótico.

<i>S. marcescens</i>		AMPICILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	301	-	-	-	-	1,0	99,0
1988	296	-	0,6	0,3	-	2,4	96,7
1989	121	-	-	-	-	4,1	95,9
1990	137	-	-	1,4	3,6	5,8	89,2
1991	115	-	-	-	0,9	6,3	92,8
1992	90	-	-	1,1	3,4	3,4	92,1
TOTAL	1.060	-	0,2	0,4	0,8	3,1	95,5
% acumulado			0,2	0,6	1,4	4,5	100

<i>S. marcescens</i>		AMOXICILINA/CLAVULANICO CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Año	nº	$\leq 4/2$	8/4	16/8	$>16/8$
1987	---	---	---	---	---
1988	113	-	-	1,7	98,3
1989	121	-	0,8	3,3	95,9
1990	137	-	2,2	10,2	87,6
1991	115	-	1,7	4,3	94,0
1992	90	1,1	2,3	5,7	90,9
TOTAL	576	0,2	1,2	5,1	93,5
% acumulado		0,2	1,4	6,6	100

<i>S. marcescens</i>		TICARCILINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Año	nº	$\leq 8$	16	32	64	$>64$
1987	301	52,2	5,0	3,0	1,6	38,2
1988	296	54,0	3,7	5,7	4,1	32,5
1989	121	47,9	4,2	3,3	1,6	43,0
1990	137	57,0	2,9	2,2	0,7	37,2
1991	115	49,5	6,1	2,6	1,7	40,1
1992	90	68,2	9,1	6,8	4,5	11,3
TOTAL	1.060	54,2	4,7	4,0	2,5	34,6
% acumulado		54,2	58,9	62,9	65,4	100

<i>S. marcescens</i>		CEFAZOLINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	2	4	8	16	$>16$
1987	301	-	-	0,3	-	0,3	-	99,4
1988	296	-	-	0,3	-	-	-	99,7
1989	121	-	-	-	-	-	-	100,0
1990	137	-	-	-	-	-	-	100,0
1991	115	-	-	-	-	-	-	100,0
1992	90	-	-	-	-	-	1,1	98,9
TOTAL	1.060	-	-	0,2	-	0,1	0,1	99,6
% acumulado				0,2		0,3	0,3	100

TABLA 20.- *Serratia marcescens* (continuación).

<i>S. marcescens</i>		CEFUROXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	301	-	1,0	0,3	-	1,3	97,4
1988	296	-	0,3	0,7	1,0	1,7	96,3
1989	121	-	-	0,8	-	2,5	96,7
1990	137	-	-	0,7	0,7	5,8	92,8
1991	115	-	0,9	-	0,9	-	98,2
1992	90	-	1,1	-	2,3	2,3	94,3
TOTAL	1.060	-	0,5	0,4	0,5	2,0	98,6
% acumulado			0,6	1,1	1,8	2,8	100

<i>S. marcescens</i>		CEFOXITINA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 1$	2	4	8	16	$>16$
1987	301	-	-	0,7	3,6	32,9	62,8
1988	296	-	-	1,0	13,2	27,0	58,8
1989	121	-	-	1,6	18,2	33,9	46,3
1990	137	-	-	1,7	21,2	25,5	51,6
1991	115	-	-	0,9	12,2	24,3	62,6
1992	90	-	1,1	1,1	26,2	34,1	37,5
TOTAL	1.060	-	0,1	1,0	13,1	29,6	56,2
% acumulado			0,1	1,1	14,2	43,8	100

<i>S. marcescens</i>		CEFOTAXIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Año	nº	$\leq 2$	4	8	16	32	$>32$
1987	273	85,8	5,1	3,3	2,5	1,1	2,2
1988	260	72,8	11,5	8,8	1,9	2,3	2,7
1989	121	74,4	14,9	3,3	3,3	1,6	2,5
1990	137	80,3	5,1	5,1	2,9	3,7	2,9
1991	115	66,1	7,0	6,1	6,1	1,7	13,0
1992	90	80,6	10,2	3,4	2,3	2,3	1,1
TOTAL	996	77,5	8,6	5,3	2,9	2,1	3,6
% acumulado		77,5	86,1	91,4	94,3	96,4	100

<i>S. marcescens</i>		CEFTAZIDIMA CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )						
Año	nº	$\leq 0,5$	1	---	4	---	16	$>16$
1987	105	76,2	9,5	---	13,3	---	1,0	-
1988	296	76,7	12,5	---	9,1	---	1,0	0,7
1989	123	84,3	6,6	---	9,1	---	-	-
1990	137	88,3	6,6	---	5,1	---	-	-
1991	115	73,9	8,7	---	13,0	---	4,4	-
1992	90	84,1	6,8	---	2,3	---	3,4	3,4
TOTAL	866	80,0	9,2	---	8,8	---	1,4	0,6
% acumulado		80,0	89,2		98,0		99,4	100

TABLA 21.- Porcentaje de aislamientos sensibles por concentración de cetotaxima.

Microorganismo	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	≤0,1	0,2	0,5	1	2	4	8	16	32	>32
<i>E. coli</i>	90,4	7,6	0,4	0,6	0,6	0,2	0,1	0,04	0,02	0,04
<i>Salmonella spp.</i>	92,1	4,9	0,4	0,1	0,4	1,4	0,7	--	--	--
<i>P. mirabilis</i>	98,5	1,1	0,1	0,1	0,1	1,0	---	--	--	--
<i>K. pneumoniae</i>	92,1	4,0	0,4	0,3	0,4	0,7	0,6	0,1	0,3	1,0
<i>K. oxytoca</i>	93,7	2,8	1,3	0,6	0,3	1,3	--	--	--	--
<i>P. vulgaris</i>	83,4	2,1	0,4	0,7	1,3	4,3	1,7	0,9	0,9	4,3
<i>E. cloacae</i>	40,0	20,9	13,6	3,6	0,4	2,4	1,5	1,9	1,9	13,8
<i>E. aerogenes</i>	52,1	16,3	9,3	2,7	1,4	3,1	9,1	11,8	1,5	9,0
<i>C. freundii</i>	48,7	10,2	12,3	2,7	1,9	4,2	2,2	2,8	5,4	9,6
<i>M. morganii</i>	71,7	4,6	3,4	1,9	2,3	5,7	4,7	2,9	1,1	1,7
<i>S. marcescens</i>	10,7	12,9	27,1	18,7	8,1	8,6	5,3	2,9	2,1	3,6

TABLA 22.- Porcentaje de aislamientos sensibles por concentración de ceftazidima.

Microorganismos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	≤0,1	0,2	0,5	1	2	4	8	16	>16
<i>E. coli</i>	71,4	23,6	3,4	0,5	0,3	0,4	0,2	0,16	0,04
<i>Salmonella spp.</i>	22,6	54,2	20,1	0,5	--	--	--	--	2,6
<i>P. mirabilis</i>	92,6	3,6	2,8	0,6	0,3	0,1	--	--	--
<i>K. pneumoniae</i>	56,6	24,2	14,9	2,0	0,4	0,6	0,3	0,8	0,2
<i>K. oxytoca</i>	82,1	6,4	9,3	2,1	--	0,1	--	--	--
<i>P. vulgaris</i>	90,3	5,1	1,2	1,5	0,5	0,5	--	0,9	--
<i>E. cloacae</i>	16,9	35,9	23,4	4,3	1,4	1,1	0,4	1,7	14,9
<i>E. aerogenes</i>	18,6	21,6	9,8	6,7	2,4	1,2	2,6	5,4	31,7
<i>M. morganii</i>	61,8	7,4	6,8	6,3	2,6	2,1	2,3	6,5	4,2
<i>C. freundii</i>	26,8	24,7	20,2	7,1	2,3	0,7	0,4	1,1	16,7
<i>S. marcescens</i>	20,8	46,8	12,4	9,2	6,1	2,7	0,6	0,8	0,6

## 2.- ANALISIS DE LOS FENOTIPOS DE SENSIBILIDAD - RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS EN *Enterobacteriaceae* (1987-1992).

Los fenotipos de sensibilidad-resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (TABLAS 23-31) se establecieron a partir de la distribución de aislamientos inhibidos por cada concentración de antibiótico (TABLAS 10-20) y utilizando como criterio de resistencia los puntos críticos reseñados en la TABLA 7. Para la cefotaxima y la ceftazidima se amplió el rango de concentraciones, por el método de dilución en agar, para un número representativo del total de las cepas estudiadas (TABLAS 21 y 22). Estos últimos microorganismos procedían en su mayoría de hemocultivos y orinas y, en menor medida, de exudados quirúrgicos y respiratorios (344,345,347,346,350). El número de aislamientos incluye: 653 *E. coli*, 208 *Salmonella spp.*, 108 *P. mirabilis*, 166 *K. pneumoniae*, 54 *K. oxytoca*, 38 *P. vulgaris*, 90 *M. morganii*, 127 *E. cloacae*, 32 *E. aerogenes*, 86 *C. freundii* y 140 *S. marcescens*.

### 2.1.- *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Proteus mirabilis*.

Con respecto a *E. coli*, y siguiendo la clásica diferenciación de los fenotipos en función de la sensibilidad a la ampicilina y las carboxipenicilinas descrita por Medeiros y cols. (367) y aplicada con posterioridad por Loza y Martínez-Beltrán (319), se establecieron tres grandes grupos. El primero de ellos (fenotipo I), sensible a la ampicilina y la ticarcilina, representó más del 40% de los aislamientos; el segundo, y más numeroso (55,6%), estuvo definido por la resistencia a ambos antibióticos (fenotipos II-V); y por último, el minoritario (0,6%) se caracterizó por presentar resistencia disociada a la ampicilina y la ticarcilina (fenotipos VI y VII) (TABLA 23). Dentro del segundo grupo se diferenciaron, en función del resto de los antibióticos, varios fenotipos. El más común, fenotipo II (31,4%), mostró sensibilidad a la amoxicilina/clavulánico y a todas las cefalosporinas ensayadas. La resistencia a la amoxicilina/clavulánico y/o cefalosporinas caracterizó a los fenotipos III (22,7%), V (1,2%) y IV (0,2%), en el que están incluidas todas las cepas de *E. coli* con BIPEA.

Este mismo esquema fue útil para *Salmonella* y *P. mirabilis*, aún con una incidencia diferente a la encontrada en *E. coli*. En *Salmonella* se observó un fenotipo mayoritario (I) sensible a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que engloba el 80,4% de los aislamientos, mientras que el 18,9% (fenotipos II-V) mostró resistencia simultánea a la ampicilina y la ticarcilina y, de forma testimonial, un 0,7% (fenotipos VI y VII, 7 cepas) fueron resistentes a la ampicilina y sensibles a la ticarcilina (TABLA 24). Por el contrario, en *P. mirabilis*, aún cuando el fenotipo I fue el más prevalente (63,1%), los aislamientos resistentes a la ampicilina y sensibles a la ticarcilina fueron más



numerosos (fenotipos VI y VII, 12,0%) (TABLA 25). Debemos destacar el número anormalmente elevado de aislamientos de *Salmonella* adscritos al fenotipo IV (2,6%) debido a la existencia de 25 cepas de *S. arizonae* con una BIPEA. Este fenotipo no se observó en *P. mirabilis*.

**TABLA 23.-** Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Escherichia coli*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S	S	S	S	S	S	43,8
II	R	R	S	S	S	S	S	S	31,5
III	R	R	R	S/R	S/R	S	S	S	22,7
IV	R	R	S/R	R	R	S	R	R	0,2
V	R	R	R	R	R	R	S/R	R	1,2
VI	R	S	R	S/R	S/R	S/R	S	S	0,4
VII	R	S	R	R	R	R	S/R	R	0,2

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

**TABLA 24.-** Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Salmonella spp.*

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S	S	S	S	S	S	80,4
II	R	R	S	S	S	S	S	S	11,3
III	R	R	R	S/R	S/R	S	S	S	4,7
IV	R	R	S/R	R	R	S	R	R	2,6
V	R	R	R	R	R	S/R	S/R	R	0,3
VI	R	S	R	S/R	S/R	S/R	S	S	0,5
VII	R	S	R	R	R	R	S/R	R	0,2

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

**TABLA 25.-** Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Proteus mirabilis*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S	S	S	S	S	S	63,1
II	R	R	S	S	S	S	S	S	13,3
III	R	R	S/R	R	S/R	S	S	S	11,2
IV	R	R	S/R	R	R	S	R	R	---
V	R	R	R	R	R	R	S/R	R	0,4
VI	R	S	S	S	S	S	S	S	11,4
VII	R	S	R	R	R	R	S/R	R	0,6

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

## 2.2.- *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

La mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae* (97,7%) y *K. oxytoca* fueron resistentes a la ampicilina y la ticarcilina (fenotipos II al VI) (TABLA 26). La diferenciación de éstos estuvo marcada, en primer lugar, por la sensibilidad a la cefazolina y amoxicilina/clavulánico (mayor en *K. pneumoniae* que en *K. oxytoca*) (fenotipo II) y en segundo lugar, por la resistencia a la cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima (fenotipos III-VI). El porcentaje de aislamientos resistentes a la cefoxitina fue relativamente bajo (menos del 3%), distribuyéndose entre los fenotipos VI y VII. Por otra parte, las  $\beta$ PEA, cuya presencia sólo se demostró en *K. pneumoniae*, conformaron el fenotipo V (1,6%).

TABLA 26.- Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Klebsiella*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	<i>K. pneum.</i>	<i>K. oxytoca</i>
I	S	S	S	S	S	S	S	S	2,0 <sup>a</sup>	1,8
II	R	R	S	S	S	S	S	S	87,9	60,4
III	R	R	S/R	R	S/R	S	S/R	S	4,9	35,6
IV	R	R	R	R	R	S	S	R	0,8	0,2
V	R	R	S/R	R	R	S	R	R	1,6	--
VI	R	R	R	R	R	R	S/R	R	2,5	1,3
VII	R	S	S/R	R	R	S/R	S/R	S/R	0,3	0,7

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; a: % de incidencia.

## 2.3.- *Proteus vulgaris*.

La incidencia de aislamientos sensibles a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue inferior al 3% (fenotipo I). Si exceptuamos un mínimo porcentaje, 0,6% (fenotipo II), la resistencia simultánea a la ampicilina y la ticarcilina en esta especie estuvo acompañada de resistencia a la cefazolina y la cefuroxima (fenotipos III-V, 44,8%). En este último grupo, el fenotipo más numeroso (fenotipo III, 31,2%) se caracterizó por su sensibilidad a la amoxicilina/clavulánico, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima. La resistencia a estos antibióticos determinó la diferenciación de los fenotipos IV y V. Entre los fenotipos con resistencia a la ampicilina y sensibilidad a la ticarcilina destacó el número VI, que con un 49,7% fue el más numeroso (TABLA 27).

TABLA 27.- Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Proteus vulgaris*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S	S	S	S	S	S	2,8
II	R	R	S	S	S	S	S	S	0,6
III	R	R	S	R	R	S	S	S	31,2
IV	R	R	S/R	R	R	S	R	S	10,7
V	R	R	R	R	R	R	R	R	2,9
VI	R	S	S	S/R	S/R	S	S	S	49,7
VII	R	S	R	R	R	S/R	S/R	S/R	2,1

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

#### 2.4.- *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens*.

La participación de mecanismos genéticos de resistencia comunes en este grupo (502,503) permite el análisis conjunto de los fenotipos de sensibilidad-resistencia. En todos los casos se observó un número variable de aislamientos sensibles a la ampicilina y ticarcilina (fenotipo I), máximo en *C. freundii* (18,2%) y mínimo en *S. marcescens* (1,4%). En este fenotipo la sensibilidad no fue siempre extensible a todos los  $\beta$ -lactámicos, detectándose aislamientos resistentes a la cefazolina (*M. morganii*) o con un perfil de resistencia más amplio que incluía cefazolina, amoxicilina/clavulánico y cefoxitina (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii* y *S. marcescens*) (TABLAS 29-31).

Con la excepción de *E. aerogenes*, el fenotipo más frecuente fue el VI, que está definido por la resistencia a la ampicilina, amoxicilina/clavulánico y cefazolina, y sensibilidad a la cefotaxima y ceftazidima. La resistencia a cefoxitina, común en *E. cloacae* y *C. freundii*, varía en *M. morganii* y *S. marcescens*. Por otra parte, la resistencia a la cefotaxima y ceftazidima determinó la diferenciación de los fenotipos IV, V y VII. Los dos primeros mostraron resistencia simultánea a la ampicilina y ticarcilina y el último resistencia disociada. Globalmente, estos tres fenotipos (IV, V y VII), fueron más frecuentes en *E. aerogenes* (43,3%) que en *C. freundii* (26,1%), *S. marcescens* (22,5%), *E. cloacae* (21,9%) y *M. morganii* (18,4%).

La sensibilidad a la cefotaxima y la ceftazidima con resistencia a la ticarcilina (fenotipos II y III) fue máxima en *S. marcescens* (26,9%) y mínima en *M. morganii* (7,9%). Las cifras observadas en el resto de las especies incluidas en este grupo fueron: *E. aerogenes*, 18,1%; *C. freundii*, 16,6%; y *E. cloacae*, 12,6%.

TABLA 28.- Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Enterobacter*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	<i>E.cloacae</i>	<i>E.aerogenes</i>
I	S	S	S/R	S/R	S	S/R	S	S	10,8 <sup>a</sup>	7,2
II	R	R	S/R	S/R	S	S	S	S	2,4	2,1
III	R	R	R	R	S/R	R	S	S	10,2	16,0
IV	R	R	R	R	R	R	S/R	S/R	2,4	6,1
V	R	R	R	R	R	R	R	R	9,9	31,8
VI	R	S	R	R	S/R	R	S	S	54,7	31,4
VII	R	S	R	R	R	R	R	R	9,6	5,4

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; a: % de incidencia.

TABLA 29.- Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Citrobacter freundii*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S/R	S/R	S	S/R	S	S	18,2
II	R	R	S/R	S/R	S	S	S	S	2,4
III	R	R	R	R	S/R	R	S	S	14,2
IV	R	R	R	R	R	R	R	S	4,9
V	R	R	R	R	R	R	R	R	13,9
VI	R	S	R	R	S/R	R	S	S	39,1
VII	R	S	R	R	R	R	R	R	7,3

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

TABLA 30.- Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Morganella morganii*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S	S/R	S	S	S	S	1,7
II	R	R	S/R	R	S	S	S	S	2,4
III	R	R	R	R	S/R	S	S	S	5,5
IV	R	R	R	R	R	S/R	R	S/R	7,3
V	R	R	R	R	R	R	R	R	1,6
VI	R	S	R	R	S/R	S/R	S	S	72,0
VII	R	S	R	R	R	R	R	R	9,5

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

**TABLA 31.-** Fenotipos de sensibilidad - resistencia en *Serratia marcescens*.

Fenotipo	AMP	TIC	AMC	KFZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	%
I	S	S	S/R	S/R	S	S	S	S	1,4
II	R	R	S/R	R	R	S	S	S	7,0
III	R	R	R	R	R	S/R	S	S	19,9
IV	R	R	R	R	R	S/R	R	S	11,7
V	R	R	R	R	R	R	R	R	4,2
VI	R	S	R	R	R	S/R	S	S	50,9
VII	R	S	R	R	R	R	R	R	6,6

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; TIC: ticarcilina; KFZ: cefazolina; CXM: cefuroxima;  
FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

### 3.- DEFINICION DE FENOTIPOS CONFERIDOS POR PROTOTIPOS DE $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

Previo al estudio de sensibilidad, y teniendo como objetivo la obtención de resultados homogéneos en la expresión de las  $\beta$ lPEA que no fuesen interferidos por las características del hospedador, se procedió con las cepas con los prototipos de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y espectro ampliado a la obtención de transconjugantes utilizando la cepa *E. coli* K12 BM21 (27) como receptor de los plásmidos que las codifican. Posteriormente se analizó el perfil de sensibilidad de cada transconjugante a 30 antibióticos  $\beta$ -lactámicos por el método de dilución en agar, con un amplio rango de concentraciones, diluciones en base 2 desde 1.024 ó 128  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , y se comparó con el obtenido por las técnicas de microdilución (sistema semiautomático PASCO) de difusión con disco y el sistema comercial Epsilon-Test (E-Test) (12,70,77). Los grupos fenotípicos con los prototipos de las  $\beta$ lPEA se establecieron con los valores de CMI (dilución en agar) de la ceftazidima, el aztreonam y la cefotaxima, subdividiéndose cada uno de ellos en dos según su origen genético: TEM ó SHV (TABLAS 32 y 33). La actividad de otros antimicrobianos permitió definir características particulares dentro de cada subgrupo.

Los valores de CMI para la ampicilina, amoxicilina, carbenicilina y ticarcilina fueron, con la excepción de TEM-4, TEM-5 y TEM-12, superiores a 1.024  $\mu\text{g/ml}$ . Por el contrario, la piperacilina nunca alcanzó este valor, siendo el rango obtenido con las enzimas derivadas de TEM (64-256  $\mu\text{g/ml}$ ) inferior al observado con las derivadas de SHV (256-512  $\mu\text{g/ml}$ ). Con la asociación piperacilina/tazobactam se obtuvo un rango de 4/0,5 a 8/1  $\mu\text{g/ml}$  para las  $\beta$ lPEA de tipo TEM y de 16/1 a 64/8  $\mu\text{g/ml}$  para las de tipo SHV. Estas diferencias fueron menos acusadas con las asociaciones de amoxicilina/ácido clavulánico o ticarcilina/ácido clavulánico.

En general, se observó una mayor elevación de los valores de CMI de las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, incluyendo las cefalosporinas orales cefixima y cefdinir, con las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM que con las de tipo SHV. Por el contrario, los valores obtenidos para los metoxi- $\beta$ -lactámicos (temocilina y cefamicinas) y los carbapenems fueron muy similares. Sólo la codificación de TEM-12 determinó un valor de CMI para el imipenem de 1  $\mu$ g/ml, considerablemente mayor que con el resto de la BIPEA (0,06-0,2  $\mu$ g/ml).

**TABLA 32.-** Grupos fenotípicos de sensibilidad ( $\mu$ g/ml) de *Escherichia coli* K12 BM21 con diferentes  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y BIPEA de tipo TEM.

Antibiótico	$\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro		$\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado						
			GRUPO Ia		GRUPO IIa	GRUPO IIIa			
	TEM-1 pI 5,4	TEM-2 pI 5,6	TEM-3 pI 6,3	TEM-4 pI 5,9	TEM-6 pI 5,9	TEM-5 pI 5,55	TEM-7 pI 5,41	TEM-8 pI 5,9	TEM-12 pI 5,25
Ampicilina	>1024	>1024	>1024	512	>1024	512	>1024	>1024	1024
Amoxicilina	>1024	>1024	>1024	512	>1024	512	>1024	>1024	1024
Piperacilina	256	512	256	64	64	64	256	256	128
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024
Amox./clav.	8/4	8/4	8/4	8/4	8/4	8/4	16/8	8/4	8/4
Ticar./clav.	32/2	16/2	32/2	16/2	32/2	16/2	8/2	16/2	16/2
Piper./tazo.	4/0,5	16/2	8/1	4/0,5	8/1	8/1	8/1	4/0,5	4/0,5
Cefalotina	32	>128	128	>128	32	128	16	64	64
Cefazolina	4	8	64	64	16	64	8	16	32
Cefamandol	1	2	16	8	8	16	4	8	8
Cefuroxima	4	8	32	32	4	16	8	8	16
Cefaclor	8	16	128	>128	16	128	16	---	8
Cefixima	0,2	0,5	4	32	2	32	1	2	1
Cefdinir	0,2	0,5	8	8	0,5	8	0,5	1	1
Cefotaxima	0,03	0,06	8	8	0,5	1	0,5	1	0,5
Ceftizoxima	0,03	0,06	4	4	0,2	1	0,2	2	1
Ceftriaxona	0,03	0,06	4	8	4	2	2	2	2
Cefpiroma	0,06	0,2	1	1	1	1	2	1	4
Ceftazidima	0,1	0,5	16	8	64	32	16	64	32
Aztreonam	$\leq$ 0,01	0,1	16	4	32	4	2	8	0,5
Carumonam	$\leq$ 0,01	0,06	0,5	2	4	2	0,1	1	0,2
Temocilina	4	8	8	8	8	4	8	8	16
Cefoxitina	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Cefminox	2	2	2	2	1	2	1	1	2
Cefotetan	0,06	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	1	1
Moxalactam	0,06	0,2	0,5	1	1	1	0,5	1	1
Imipenem	0,06	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	1
Meropenem	$\leq$ 0,01	0,03	$\leq$ 0,01	$\leq$ 0,01	0,03	0,03	$\leq$ 0,01	$\leq$ 0,01	0,03
Biapenem	$\leq$ 0,01	0,03	0,03	$\leq$ 0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

**TABLA 33.-** Grupos fenotípicos de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) de *Escherichia coli* K12 BM21 con diferentes  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y  $\beta$ lPEA de tipo SHV.

Antibiótico	$\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro	$\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado				
		GRUPO Ib		GRUPO IIb		GRUPO IIIb
		SHV-1 pI 7,6	SHV-2 pI 7,6	SHV-3 pI 6,98	SHV-4 pI 7,8	SHV-5 pI 8,2
Ampicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Amoxicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Piperacilina	512	512	512	512	256	256
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Amox./clav.	16/8	16/8	16/8	16/8	8/4	8/4
Ticar./clav.	32/2	32/2	64/2	64/2	16/2	64/2
Piper./tazo.	64/8	64/8	64/8	64/8	16/1	---
Cefalotina	32	128	>128	>128	>128	128
Cefazolina	8	32	128	>128	128	32
Cefamandol	2	16	32	32	64	---
Cefuroxima	4	64	64	128	16	16
Cefaclor	16	64	>128	128	>128	---
Cefixima	0,5	8	8	64	64	---
Cefdinir	0,5	8	16	32	16	---
Cefotaxima	0,06	32	32	16	8	0,5
Ceftizoxima	0,06	16	16	32	32	1
Ceftriaxona	0,06	32	32	32	16	0,5
Cefpiroma	0,1	16	16	8	2	0,1
Ceftazidima	0,2	16	16	64	64	32
Aztreonam	0,06	16	16	64	64	2
Carumonam	$\leq 0,01$	2	1	16	8	---
Temocilina	8	16	16	32	16	16
Cefoxitina	4	2	4	4	2	2
Cefminox	2	4	2	2	2	---
Cefotetan	0,1	0,2	1	1	0,5	---
Moxalactam	0,1	0,5	1	0,5	0,5	1
Imipenem	0,06	0,1	0,06	0,06	0,06	0,06
Meropenem	$\leq 0,01$	0,03	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,03	$\leq 0,01$
Biapenem	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	$\leq 0,01$

### 3.1. Diferenciación de grupos fenotípicos.

Los grupos fenotípicos establecidos fueron:

Grupo I. Comprende aquellas  $\beta$ lPEA que determinan valores similares de CMI para la ceftazidima, el aztreonam y la cefotaxima (igual CMI ó  $\pm$  una dilución), distinguiéndose 2 subgrupos Ia y Ib.

CAZ = ATM = CTX

Grupo Ia: TEM-3 y TEM-4.

Grupo Ib: SHV-2 y SHV-3.

La diferenciación entre TEM-3 y TEM-4 requiere la utilización de la cefixima, el aztreonam o el carumonam, ya que el resto de las cefalosporinas de 3ª generación, ceftizoxima, ceftriaxona y cefpiroma poseen similares valores de CMI. TEM-3 y TEM-4 presentan valores de CMI de 4 a 16 veces más bajos para las cefalosporinas de 3ª generación que los que confieren las enzimas SHV-3 y SHV-4. Fenotípicamente, SHV-3 y SHV-4 son indistinguibles, mostrando tan solo SHV-3 valores mayores de CMI para la cefazolina (TABLAS 32 y 33).

**Grupo II.** Recoge aquellas BIPEA que determinan valores similares de CMI para la ceftazidima y el aztreonam, siendo ambos superiores a los de la cefotaxima (2 ó más diluciones), distinguiéndose, de nuevo, dos subgrupos IIa y IIb.

CAZ = ATM > CTX	Grupo IIa: TEM-6.
	Grupo IIb: SHV-4 y SHV-5.

TEM-6 condiciona una menor afectación de los valores de CMI para cefotaxima (0,5 µg/ml) en comparación con los obtenidos con SHV-4 y SHV-5 (8-16 µg/ml). Asimismo, las CMI para el resto de las cefalosporinas de 3ª generación, ceftizoxima, ceftriaxona y cefpiroma, son inferiores para TEM-6. Por otra parte, dentro del grupo IIb, SHV-5 determina una CMI menor para la cefpiroma (2 µg/ml) en comparación con SHV-4 (8 µg/ml) (TABLAS 32 y 33).

**Grupo III.** Comprende aquellas BIPEA que determinan valores de CMI para la ceftazidima superiores a los del aztreonam y éstos superiores o similares a los de la cefotaxima, diferenciándose dos subgrupos.

CAZ > ATM ≥ CTX	Grupo IIIa: TEM-5, 7, 8 y 12.
	Grupo IIIb: SHV-6.

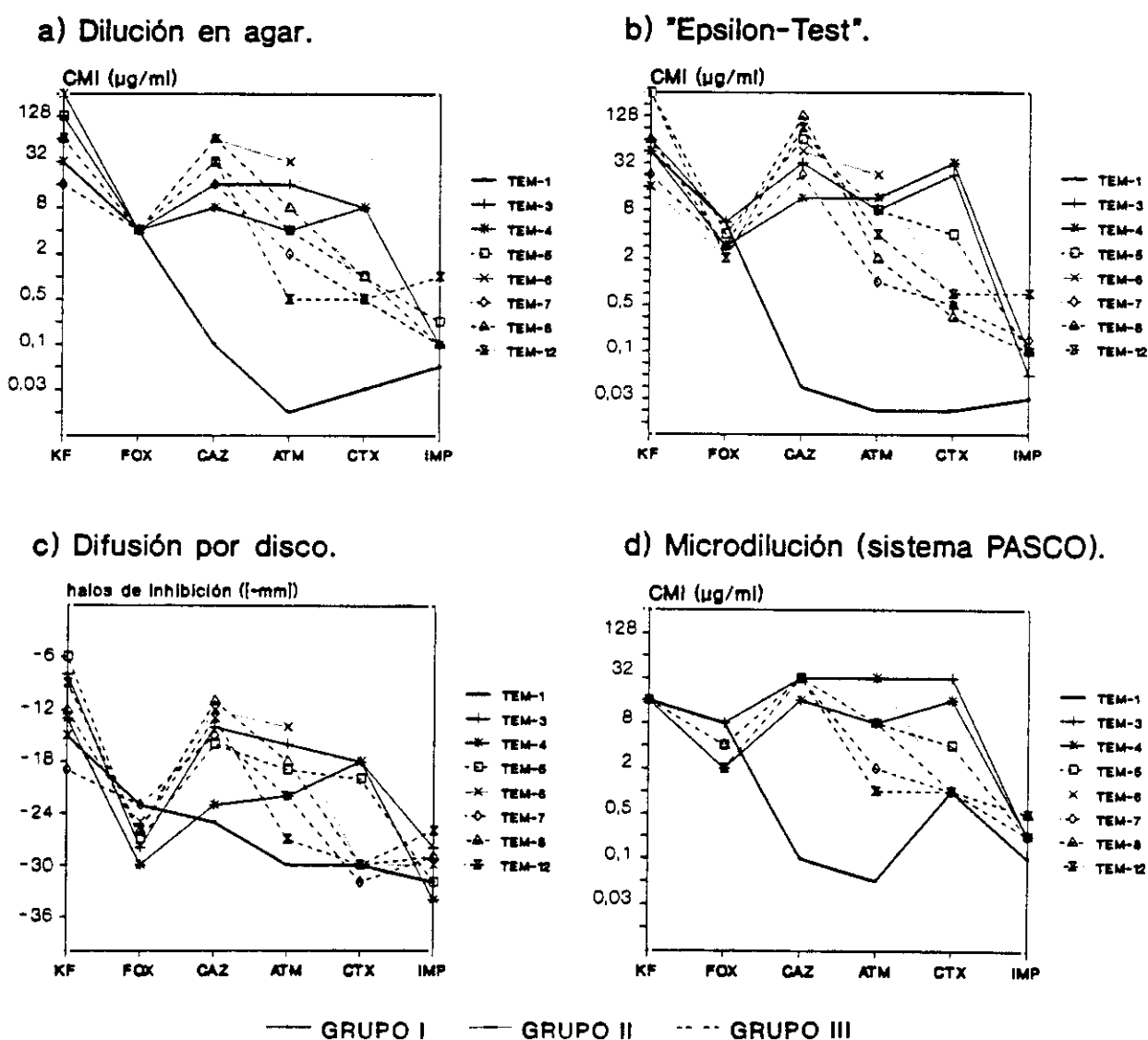
En general, los valores observados con TEM-5 para las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación fueron superiores a los observados con TEM-7, TEM-8 y TEM-12. Por el contrario, para las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam fueron muy similares. La individualización fenotípica de las enzimas incluidas dentro de este grupo requiere la definición de características particulares. TEM-7 confiere unos valores de CMI para la ceftizoxima inferiores a los que se obtienen con el resto de las enzimas de este grupo. TEM-12 condiciona un bajo valor de CMI para el aztreonam y superior para la cefpiroma en comparación con el resto de las BIPEA de tipo TEM, mientras que con SHV-6 los valores de CMI para la cefpiroma son similares a los que se obtienen con la presencia de TEM-1 y SHV-1 (TABLAS 32 y 33).



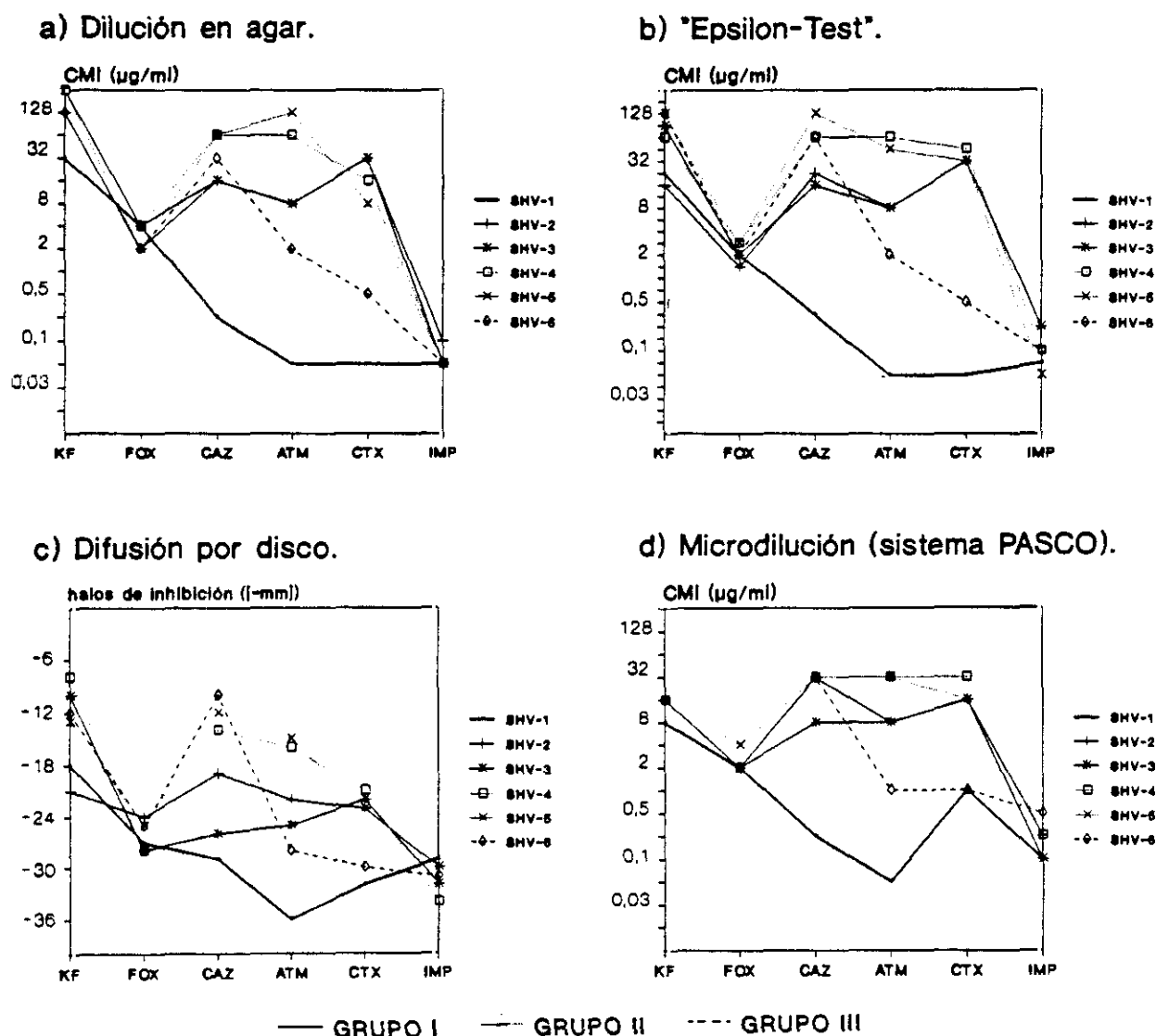
### 3.2.- Estudio comparativo de las técnicas de difusión por disco, dilución y "Epsilon-Test".

Los resultados para las distintas  $\beta$ -lactamasas prototipos TEM y SHV, obtenidos con la técnica de dilución en agar y los sistemas comerciales de microdilución (PASCO) y E-Test para la cefazolina, cefoxitina, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima e imipenem, así como los halos de inhibición (mm) para los mismos antibióticos, quedan comparativamente recogidos en las FIGURAS 4 y 5.

**FIGURA 4.-** Análisis comparativo de los perfiles de sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos en *Escherichia coli* K12 BM21 conferidos por BIPEA de tipo TEM.



**FIGURA 5.-** Análisis comparativo de los perfiles de sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos en *Escherichia coli* K12 BM21 conferidos por BIPEA de tipo SHV.



Al igual que con la dilución en agar, los valores de CMI obtenidos con el E-Test para la ceftazidima, el aztreonam y la cefotaxima, permitió establecer grupos fenotípicos con las distintas BIPEA, no así la difusión por disco y la microdilución (sistema PASCO) en los que se produjo una superposición de los distintos perfiles (FIGURAS 4 y 5). El método del E-Test para la cefotaxima, ceftazidima y aztreonam diferenció claramente TEM-1/TEM-2 y SHV-1 de las BIPEA (datos de TEM-2 no mostrados en las figuras). En este sentido, el E-Test y la dilución en agar para cefotaxima en TEM-1/TEM-2 mostraron CMI muy bajas, 0,023-0,047  $\mu\text{g/ml}$  y 0,03-0,06  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, claramente diferentes a las obtenidas con TEM-6, TEM-7, TEM-8 y TEM-12 (0,38-0,75  $\mu\text{g/ml}$  y 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$ ) y TEM-3, TEM-4 y TEM-5 (4-24  $\mu\text{g/ml}$  y 1-8  $\mu\text{g/ml}$ ). Por el

contrario, el disco de cefotaxima no discriminó TEM-1/TEM-2 de TEM-6, TEM-7, TEM-8 y TEM-12 (halos de inhibición de 30-32 mm), aunque sí lo hizo para TEM-3, TEM-4 y TEM-5 (18-20 mm). Con respecto a las  $\beta$ -lactamasas de tipo SHV, el disco de cefotaxima diferenció SHV-1 (32 mm) de SHV-2, SHV-3, SHV-4 y SHV-5 (21-23 mm), pero no de SHV-6 (30 mm). Su poder de discriminación fue inferior al E-Test y la dilución en agar, ya que estas últimas sí diferenciaron SHV-6 de SHV-1. Los valores de CMI para cefotaxima fueron 0,06  $\mu\text{g/ml}$  por el E-Test y 0,064  $\mu\text{g/ml}$  por dilución en agar para SHV-1 y 0,5  $\mu\text{g/ml}$  por ambos métodos para SHV-6.

En general, los valores obtenidos para la ceftazidima y el aztreonam con el E-Test y la dilución en agar fueron más discriminatorios que con el empleo de la difusión por disco. La ceftazidima diferenció claramente TEM-1/TEM-2 de TEM-4 con el E-Test (0,047 y 12  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) y la dilución en agar (0,1-0,5 y 8  $\mu\text{g/ml}$ ) y con menos nitidez con la difusión por disco. Asimismo, el E-Test para ceftazidima facilitó la discriminación entre TEM-6 (48  $\mu\text{g/ml}$ ) y TEM-8 (128  $\mu\text{g/ml}$ ) y entre SHV-4 (64  $\mu\text{g/ml}$ ) y SHV-5 (128  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con la dilución en agar (64  $\mu\text{g/ml}$  para las cuatro  $\beta$ -lactamasas) y entre SHV-2 (24  $\mu\text{g/ml}$ ) y SHV-3, (16  $\mu\text{g/ml}$ ) también en comparación con la dilución en agar (16  $\mu\text{g/ml}$  para ambas enzimas). Sólo utilizando el sistema de referencia, dilución en agar, o el E-Test se observaron pequeños aumentos de la CMI de imipenem para TEM-12 (1-0,75  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con los valores obtenidos para TEM-1/TEM-2 (0,03-0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) y el resto de las BIPEA (0,06-0,2  $\mu\text{g/ml}$ ).

El sistema semiautomático comercial (PASCO) fue menos discriminatorio que la técnica de difusión por disco debido al bajo número de concentraciones utilizadas, de 2 a 32  $\mu\text{g/ml}$  para cefotaxima y de 0,12 a 16  $\mu\text{g/ml}$  para la ceftazidima y el aztreonam.

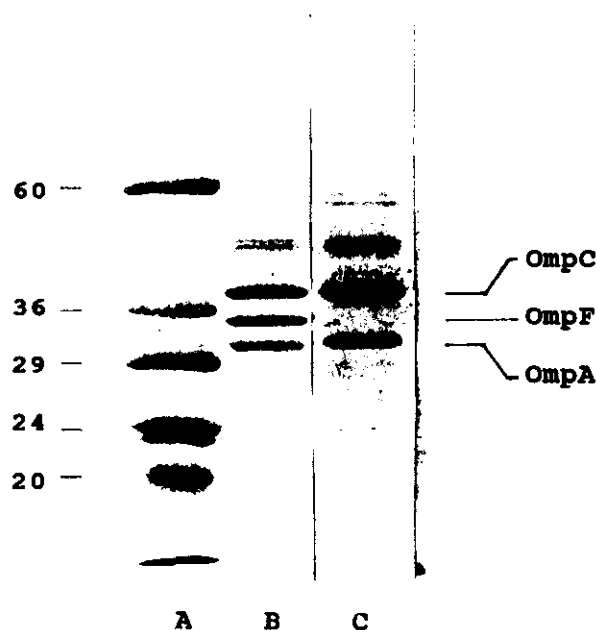
### 3.3. Influencia de mutaciones en las proteínas de membrana externa (*ompF*<sup>-</sup>).

En general, los valores de CMI de la cepa de *E. coli* MC4100 con una mutación *ompF*<sup>-</sup>, con respecto a los de su cepa isogénica, *E. coli* MH621 (*OmpF*<sup>+</sup>) (FIGURA 6), fueron superiores en 2-4 diluciones tanto con las BIPEA como las enzimas TEM-1, TEM-2 ó SHV-1.

La presencia de una mutación *ompF*<sup>-</sup> incrementó en al menos dos diluciones los valores de CMI de la ampicilina, ticarcilina (512-> 1.024  $\mu\text{g/ml}$  a > 1.024  $\mu\text{g/ml}$ ) y piperacilina (64-512  $\mu\text{g/ml}$  a 128-> 124  $\mu\text{g/ml}$ ) conferidos por las BIPEA. Con la excepción de TEM-6 y SHV-5, la mutación *ompF*<sup>-</sup> multiplicó por dos el valor de la CMI de la asociación amoxicilina/ácido clavulánico (de 8/4-16/8  $\mu\text{g/ml}$  a 16/8-32/16  $\mu\text{g/ml}$ ). Esta elevación fue superior para ticarcilina/clavulánico con todas las BIPEA de tipo TEM (de 8/2  $\mu\text{g/ml}$  a 16/2-> 32/2  $\mu\text{g/ml}$ ) y con SHV-4 y SHV-5 (8/2 a > 32/2

$\mu\text{g/ml}$ ). Para la piperacilina/tazobactam se obtuvieron valores de CMI inferiores con las  $\beta$ IPEA de tipo TEM (8/1-16/2  $\mu\text{g/ml}$ ) que con las de tipo SHV (16/2-64/8  $\mu\text{g/ml}$ ).

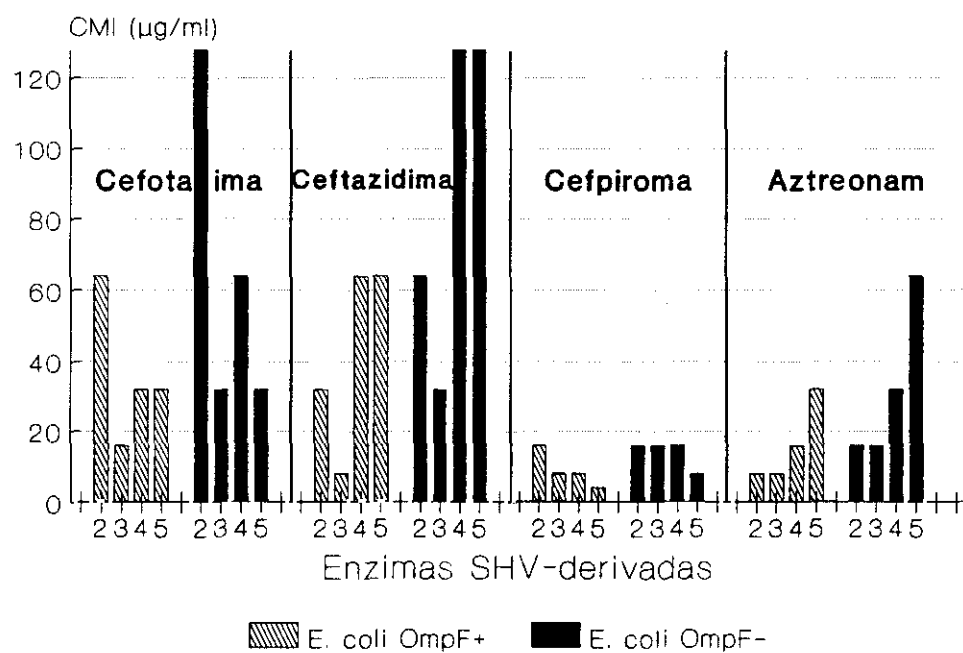
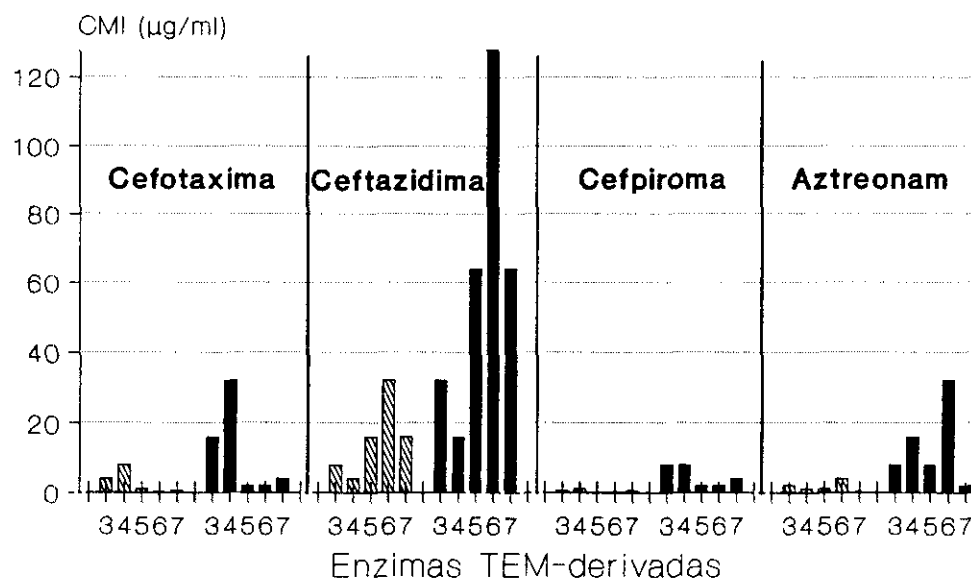
**FIGURA 6.-** Proteínas de membrana externa. A) control de pesos moleculares; B) *Escherichia coli* MH621, *ompF*<sup>+</sup>; C) *Escherichia coli* MC4100, *ompF*<sup>-</sup>.



La mutación *ompF*<sup>-</sup> no modificó los valores de CMI de TEM-6 y SHV-2 para la cefazolina (8 y 64  $\mu\text{g/ml}$ ) y cefuroxima (8 y 32  $\mu\text{g/ml}$ ) con respecto a su isogénica *ompF*<sup>+</sup>. Con el resto de las  $\beta$ IPEA, la mutación *ompF*<sup>-</sup> elevó de 2 a 8 veces los valores de las CMI de estos dos antibióticos, siendo TEM-4 y SHV-4 las más afectadas. Con independencia de la  $\beta$ IPEA, la mutación *ompF*<sup>-</sup> elevó de 2 a 4 veces las CMI de cefoxitina, cefminox, temocilina y moxalactam. Es de resaltar que en ausencia de la porina OmpF la elevación de la CMI del cefotetan fue más manifiesta en las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM (factor 4 a 8) que en las de tipo SHV (factor 2).

Por otra parte, los valores de CMI de la cefotaxima, ceftazidima, cefpiroma, aztreonam (FIGURA 7) y carumonam fueron los más afectados por la pérdida de la porina OmpF, disminuyendo de 2 a 10 veces su actividad. Entre estas cefalosporinas, la cefpiroma fue la menos afectada (2-16  $\mu\text{g/ml}$  en comparación con 2-128  $\mu\text{g/ml}$  para la cefotaxima y 16-128 para la ceftazidima). Por el contrario, el imipenem y meropenem perdieron poca actividad en ausencia de OmpF con unos valores de CMI inferiores a 1  $\mu\text{g/ml}$ .

**FIGURA 7.-** Influencia de OmpF en el perfil de sensibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos conferidos por *bla*PEA en *Escherichia coli* (MH621, *ompF*<sup>+</sup>; MC4100, *ompF*<sup>-</sup>).



#### 4.- ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO (BIPEA) EN *Enterobacteriaceae* (1987 - 1992).

En el estudio prospectivo de sensibilidad de las 24.058 *Enterobacteriaceae* aisladas en nuestro laboratorio desde marzo de 1987 a diciembre de 1992, se seleccionaron todas aquellas cepas con un fenotipo de resistencia compatible con la presencia de una BIPEA (oxiimino- $\beta$ -lactamasas). Este perfil incluía resistencia o menor sensibilidad a la cefotaxima o ceftazidima, sensibilidad a la cefoxitina y sinergia entre penicilinas e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Un estudio de sensibilidad más amplio por dilución en agar; la observación en los antibiogramas de un "halo de inhibición ampliado" para las cefalosporinas de 3ª generación o monobactams frente a discos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasa (prueba de doble difusión en disco) (259); la transferencia de la resistencia y la determinación del pl confirmaron la existencia de un total de 80 cepas con BIPEA: 25 *E. coli*, 27 *K. pneumoniae*, 25 *S. arizonae*, 1 *E. cloacae*, 1 *Enterobacter gergoviae* y 1 *S. marcescens*.

##### 4.1.- Identificación inicial.

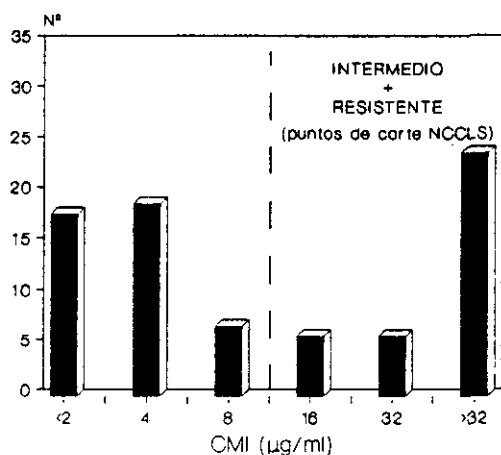
Todas las cepas con BIPEA mostraron (sistema semiautomático PASCO), resistencia simultánea a la ampicilina ( $> 16 \mu\text{g/ml}$ ) y la ticarcilina ( $> 64 \mu\text{g/ml}$ ). El 57,5% de los aislamientos tuvieron un valor de CMI para amoxicilina/clavulánico de 16/8  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que en el 27,5% fue superior a esta concentración y sólo el 15,0% inferior o igual a 8/4  $\mu\text{g/ml}$ . Con respecto a cefazolina y cefuroxima, sólo el 1,3% y el 22,5%, respectivamente, mostraron valores de CMI inferiores o iguales a 8  $\mu\text{g/ml}$ , con un valor modal, para ambas cefalosporinas, mayor de 16  $\mu\text{g/ml}$ . En general, los valores de CMI para cefoxitina oscilaron entre 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$ , obteniéndose una CMI superior o igual a 16  $\mu\text{g/ml}$  para un aislamiento de *E. coli*, dos de *K. pneumoniae* y dos *Enterobacter*.

La distribución de los valores de CMI para cefotaxima y ceftazidima (sistema PASCO) y los respectivos halos de inhibición con discos de 30  $\mu\text{g}$  queda reflejada en la FIGURA 8. En la detección inicial de las BIPEA fue preciso considerar simultáneamente los valores de CMI de cefotaxima y ceftazidima, sistema PASCO, ya que hasta un 55% de las cepas fueron catalogados como sensibles de acuerdo con los criterios establecidos por el NCCLS (397,399,400). Esta cifra se redujo a un 22,5% utilizando 4  $\mu\text{g/ml}$  como concentración crítica de sensibilidad, valor más cercano a los puntos críticos recomendados por la "Société Française de Microbiologie" (544) y su homóloga británica ("British Society for Antimicrobial Chemotherapy") (75). Los datos obtenidos con la difusión por disco mostraron, aplicando los criterios del NCCLS (396,398,400), un 48,7% de cepas "sensibles" para la cefotaxima y un 35% para ceftazidima (FIGURA 8).

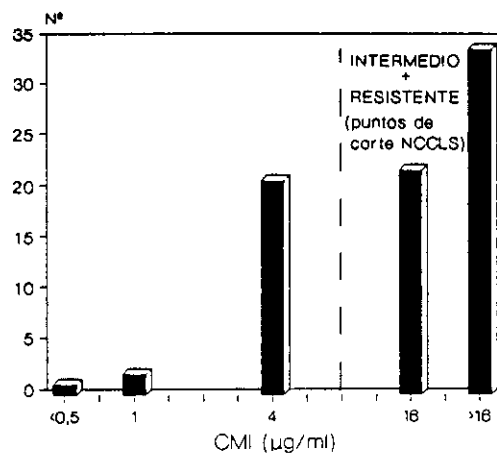
No obstante, con independencia del valor de CMI o halo de inhibición para cefotaxima y ceftazidima todos los aislamientos mostraron un "halo de inhibición ampliado" en la prueba de doble difusión con disco (FIGURA 9), siendo necesario en un 28,8% de las cepas reducir la distancia entre los discos desde 30 mm, tal como recomiendan Jarlier y cols. (259), a 20-25 mm para evidenciar este efecto.

**FIGURA 8.-** Análisis comparativo de la capacidad de identificación presuntiva de *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

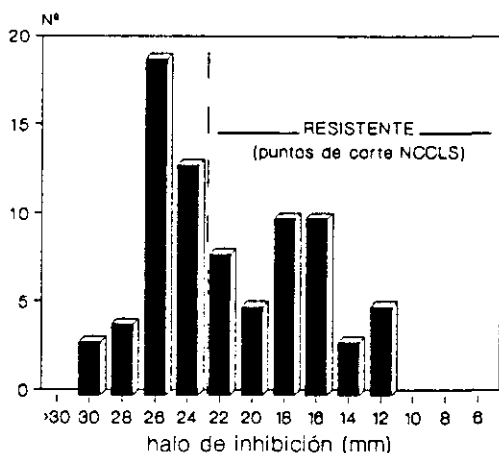
**a) CEFOTAXIMA: Sist. semiautomático**



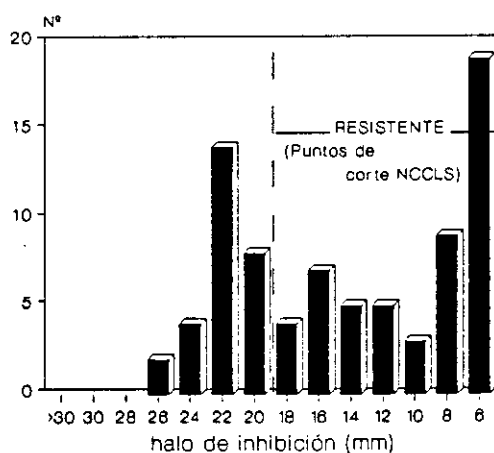
**b) CEFTAZIDIMA: Sist. semiautomático**



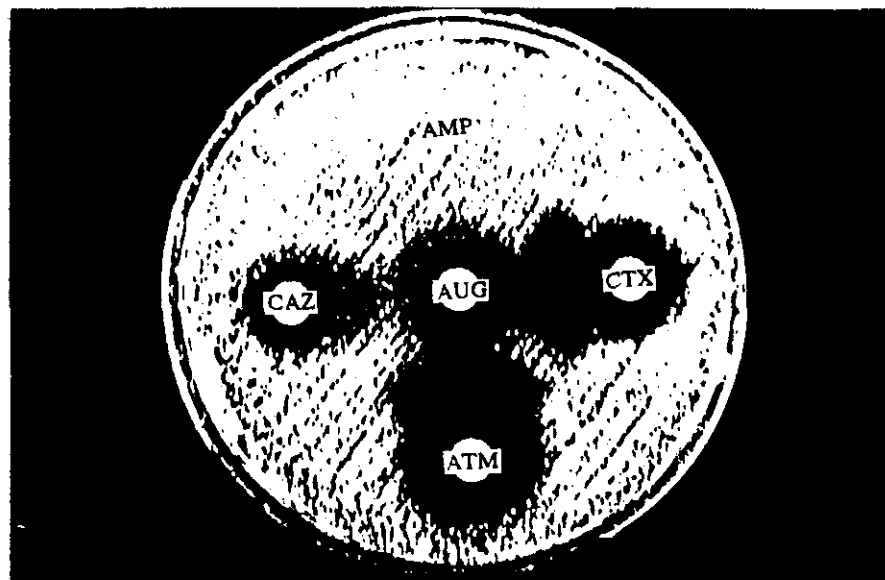
**c) CEFOTAXIMA: difusión por disco**



**d) CEFTAZIDIMA: difusión por disco**



**FIGURA 9.-** Prueba de doble difusión con discos.



*Klebsiella pneumoniae* productora de SHV-2.

(AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; AUG: amoxicilina/ácido clavulánico; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam)

#### 4.2.- Caracterización por isoelectroenfoque.

La determinación del pI en los extractos crudos sonicados permitió establecer tres grupos iniciales distribuidos en torno a tres pI distintos (FIGURAS 10-12):

Grupo 1.- pI 7,6 ..... 4 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*.

+ 7,1 ..... 1 *E. coli*.

+ 5,4 ..... 5 *E. coli*, 24 *K. pneumoniae*.

+ 5,4 + 8,8 .... 1 *E. gergoviae*.

+ 8,2 ..... 1 *K. pneumoniae*.

Grupo 2.- pI 5,9..... 2 *E. coli*, 25 *S. arizonae*.

+ 5,4 ..... 7 *E. coli*.

+ 8,0 ..... 1 *S. marcescens*.

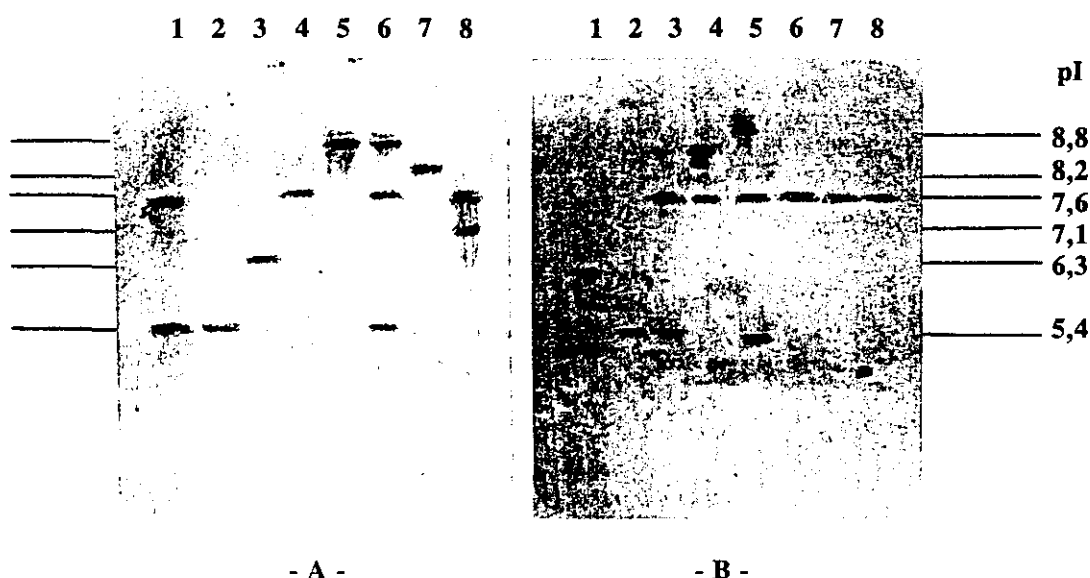
+ 8,8 ..... 1 *E. cloacae*.

Grupo 3.- pI 5,4..... 6 *E. coli*.



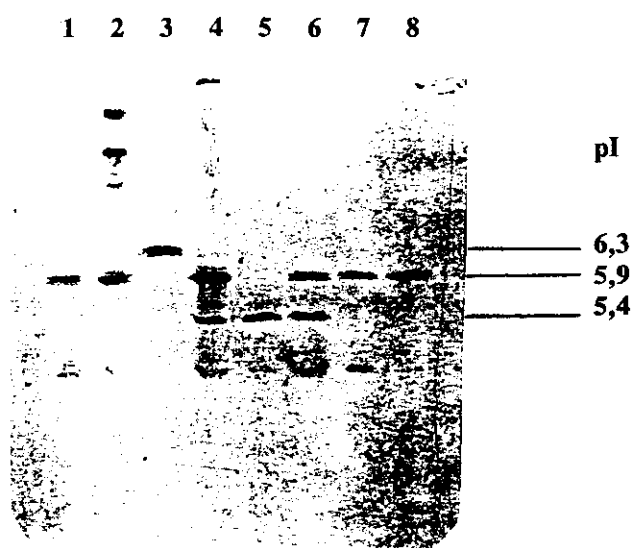
El 48,7% de las cepas mostraron una sola banda en el isoelectroenfoque, el 48,7% dos y sólo el 2,5% tres bandas. En los transconjugantes de aquellas cepas con una segunda ó tercera banda que enfocaba en la zona alcalina (7,1-8,8) no se observaron éstas. Solamente se pudo separar por conjugación la banda secundaria de la zona ácida (5,4) en un 29,7% (11/37) de los casos (3 *E. coli* y una *K. pneumoniae* del grupo 1 y 7 *E. coli* del grupo 2). Es de resaltar que en el grupo 2, a diferencia del grupo 1, no se encontró ninguna cepa de *K. pneumoniae*, mientras que todas las cepas del grupo 3 fueron *E. coli*.

**FIGURA 10.-** Grupo 1.- Isoelectroenfoque de extractos enzimáticos de *Enterobacteriaceae* con  $\beta$ IPEA de pI 7,6.



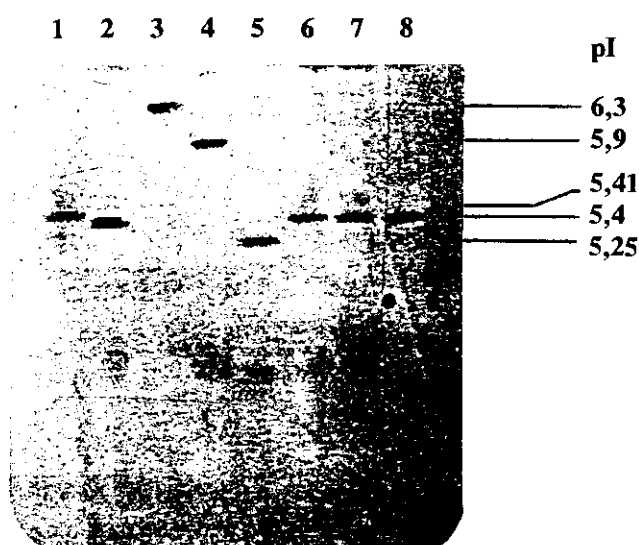
- A) Líneas, 1: *K. pneumoniae* 66877/90 (pI, 7,6+5,4); 2: *E. coli* R6K (TEM-1, pI 5,4); 3: *K. pneumoniae* CF104 (TEM-3, pI 6,3); 4: *E. coli* JC2926(pBP60-1)(SHV-2, pI 7,6); 5: *E. cloacae* RYC11439/89 (pI 8,8); 6: *E. gergoviae* 63027/91 (pI, 8,8+7,6+5,4); 7: *E. coli* J53-2(pAFF2)(SHV-5, pI 8,2); 8: *E. coli* 65907/90 (pI 7,6+7,1).
- B) Líneas, 1: *K. pneumoniae* CF104 (TEM-3, pI 6,3); 2: *E. coli* R6K (TEM-1, pI 5,4); 3: *K. pneumoniae* 65951/92 (pI, 7,6+5,4); 4: *K. pneumoniae* 56513/90 (pI, 8,2+7,6); 5: *E. gergoviae* 63027/91 (pI, 8,8+7,6+5,4); 6: *K. pneumoniae* 5162/89 (pI, 7,6); 7: *E. coli* J53-2(R1010)(SHV-1, pI 7,6); 8: *E. coli* C1A(pSLH47)(SHV-6, pI 7,6).

**FIGURA 11.-** Grupo 2.- Isoelectroenfoque de extractos enzimáticos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA de pI 5,9.



Líneas, 1: *E. coli* J53(pCFF34) (pI 5,9); 2: *S. marcescens* 51140/90 (pI 8,0+5,9); 3: *K. pneumoniae* CF104 (TEM-3, pI 6,3); 4: *E. cloacae* 39373/89 (pI 8,8+5,9); 5: *E. coli* R6K (TEM-1, pI 5,4); 6: *E. coli* 5H/89 (pI, 5,9+5,4); 7: *S. arizonae* 36536/89 (pI 5,9); 8: *E. coli* 88083101 (TEM-6, pI 5,9).

**FIGURA 12.-** Grupo 3.- Isoelectroenfoque de extractos enzimáticos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA de pI 5,4.



Líneas, 1: *E. coli* C1a(pCIF100) (TEM-7, pI 5,41); 2: *E. coli* 151521/90 (pI 5,4); 3: *K. pneumoniae* CF104 (TEM-3, pI 6,3); 4: *E. coli* 88083101 (pI 5,9); 5: *E. coli* C1a(pBR322-C3)(TEM-12, pI 5,25); 6: *E. coli* R6K (TEM-1 pI 5,4); 7: *E. coli* 47676/90 (pI 5,4); 8: *E. coli* Tc-47676/90 (pI 5,4).

#### 4.3.- Grupo 1.- BIPEA de pI 7,6: Fenotipos SHV-2 y SHV-6.

El número de aislamientos con una banda de pI 7,6 en el isoelectroenfoque fue de 38, y comprendió 27 cepas de *K. pneumoniae*, 10 de *E. coli* y una de *E. gergoviae* que procedían de 28 pacientes. El patrón de resistencia permitió diferenciar dos subgrupos: a) el primero y más numeroso, 35 cepas, asociado a un perfil típico de SHV-2, se caracterizó por tener unos valores de CMI muy similares para la cefotaxima, la ceftazidima y el aztreonam; b) el segundo, compatible con el perfil descrito para la enzima SHV-6 (17), mostró unos valores de CMI para la ceftazidima superiores a los del aztreonam y ambos claramente más elevados que los de la cefotaxima. El estudio bioquímico y genético de las  $\beta$ -lactamasas implicadas, en comparación con los prototipos de las BIPEA, confirmó la adscripción de estos dos fenotipos a enzimas del tipo SHV-2 y SHV-6.

##### 4.3.1.- Perfil de sensibilidad y sinergia.

El perfil de sensibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y otros antimicrobianos de los aislamientos con BIPEA de pI 7,6 queda recogido en las TABLAS 34 y 35. La ceftazidima, el aztreonam y la cefotaxima, utilizados para establecer los grupos fenotípicos, mostraron en los aislamientos con perfil SHV-2 unos valores de CMI que oscilaron entre 0,5 y 64  $\mu\text{g/ml}$ . Asimismo, el rango para la cefpiroma y ceftizoxima fue también amplio, 0,1-32  $\mu\text{g/ml}$ , y algo menor para la ceftriaxona, 2-32  $\mu\text{g/ml}$ . Estos valores fueron corroborados con el E-Test para la ceftazidima, 2-24  $\mu\text{g/ml}$ , el aztreonam, 0,38-12  $\mu\text{g/ml}$  y la cefotaxima, 1-48  $\mu\text{g/ml}$  (FIGURA 13). La presencia de una segunda banda de pI 5,4, presumiblemente TEM-1, en 5 cepas de *E. coli* y 24 de *K. pneumoniae* ó de pI 8,2 en 1 cepa de *K. pneumoniae* no incrementó los valores de CMI para las cefalosporinas de 3ª generación. Por el contrario, la  $\beta$ -lactamasa de pI 5,4 elevó los valores de CMI para la piperacilina desde 512  $\mu\text{g/ml}$  hasta 1024->1024  $\mu\text{g/ml}$ . Asimismo, la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de pI 8,8 en la cepa de *E. gergoviae* incrementó la CMI de la cefotaxima hasta 64  $\mu\text{g/ml}$  respecto del *E. coli* transconjugante que mostraba una CMI de 8  $\mu\text{g/ml}$ .

El segundo perfil de sensibilidad asociado con un pI de 7,6 y caracterizado posteriormente como SHV-6, se encontró en 1 cepa de *K. pneumoniae* y 2 de *E. coli*. Estos aislamientos mostraron un patrón similar al de SHV-2 en cuanto a los valores de CMI para la ceftazidima, 4-32  $\mu\text{g/ml}$ , siendo inferiores los de la cefpiroma, 0,5-2  $\mu\text{g/ml}$ , aztreonam, 1-4  $\mu\text{g/ml}$ , cefotaxima, 0,2-0,5  $\mu\text{g/ml}$ , ceftizoxima, 0,06-0,1  $\mu\text{g/ml}$ , y ceftriaxona 0,1-0,5  $\mu\text{g/ml}$ . La presencia de una banda asociada de pI 7,1, coincidente con OXA-3 (91), en una cepa de *E. coli*, no modificó los valores de CMI con respecto a su transconjugante y al de los otros aislamientos que carecían de ella.

TABLA 34.- Grupo 1, fenotipo SHV-2: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) y actividad enzimática.

Antibiótico	Perfil SHV-2					
	pI 7,6		pI 7,6 + 5,4		pI 7,6+8,2	pI 7,6+5,4+8,8
	<i>E. coli</i> (3)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>E. coli</i> (5)	<i>K. pneumoniae</i> (24)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>E. gergoviae</i> (1)
Ampicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Piperacilina	512	512	1024->1024	1024->1024	512	>1024
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Azlocilin	1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024
Mezlocilina	512-1024	>1024	1024	256->1024	512	>1024
Amox./clav.	16/8	32/16	32/16	4/2-32/16	8/4	32/16
Piper./tazo.	16/2	>32/4	8/1-16/2	8/1->32/4	16/2	32/4
Ticar./clav.	>32/2	>32/2	>32/2	16/2->32/2	32/2	>32/2
Cefalotina	256-512	512	32-64	256-512	512	512
Cefazolina	256	512	16	32-512	256	512
Cefuroxima	64	64	16	8-64	32	64
Cefotaxima	8-16	32	4-8	1-64	8	64
Ceftizoxima	8	8	4-16	0,5-32	2	16
Ceftriaxona	16	16	8	2-32	8	32
Cefpiroma	8	4	4	0,1-16	2	32
Ceftazidima	32	64	16-32	0,5-32	16	8
Aztreonam	8	16	16-32	0,5-16	4	16
Carumonam	2	2	1-2	0,1-4	0,5	4
Temocilina	8	4	8-16	2-16	4	---
Cefoxitina	2-4	8	2-4	2-8	4	16
Cefotetan	1	2	0,5-1	0,2-2	2	4
Moxalactam	0,1-0,2	1	1-2	0,2-1	1	4
Imipenem	0,1	0,5	0,1	0,1-0,5	0,1	0,2
Meropenem	$\leq 0,01$	0,06	0,06-0,03	0,03-0,06	0,03	0,06
Gentamicina	1	32	>128	0,5-128	0,5	0,5
Tobramicina	0,5-1	8	64	0,5-64	0,5	0,5
Amicacina	0,5-1	1	1	0,5-16	0,5	0,5
A. nalidixico	1-2	1	1	1-2	1	2
Ciprofloxacina	$\leq 0,01$	0,03	0,03	$\leq 0,01-0,06$	$\leq 0,01$	0,03
Fosfomicina	2	2	0,1-0,2	0,5-32	32	1
Actividad enzimática <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,02	0,48	0,87 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,27	1,31	12,8(1,09 <sup>b</sup> )

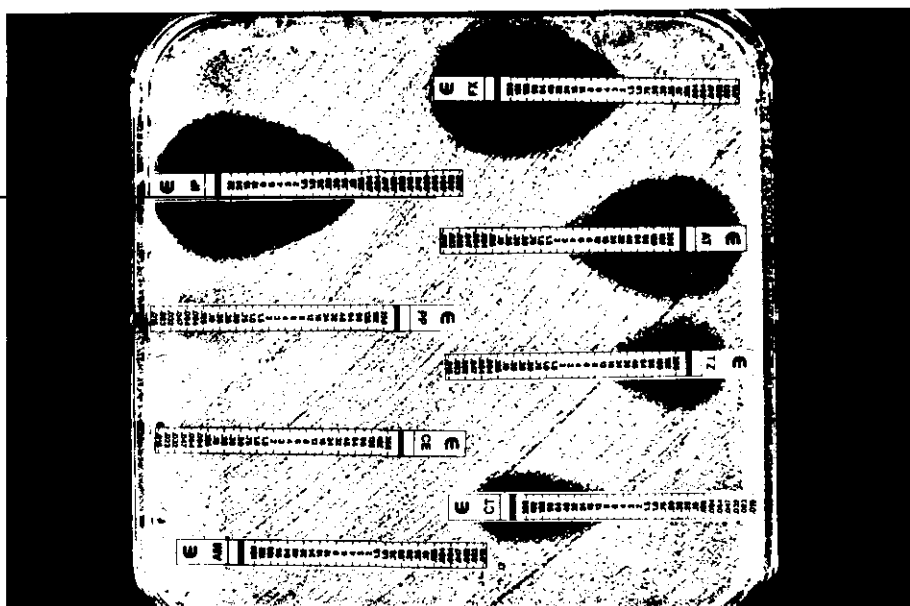
<sup>a</sup>: mU/min/mg de proteína; <sup>b</sup>: actividad enzimática del transconjugante pI 7,6+5,4.

TABLA 35.- Grupo 1, fenotipo SHV-6: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) y actividad enzimática.

Antibiótico	Perfil SHV-6		
	pI 7,6		pI 7,6+7,1
	<i>E. coli</i> (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)
Ampicilina	>1024	>1024	>1024
Piperacilina	512	>1024	512
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	1024
Azlocilin	>1024	>1024	1024
Mezlocilina	512	>1024	1024
Amox./clav.	16/8	32/16	16/8
Piper./tazo.	>32/4	>32/4	16/2
Ticar./clav.	>32/2	>32/2	32/2
Cefalotina	256	256	512
Cefazolina	64	128	256
Cefuroxima	8	8	8
Cefotaxima	0,2	0,2	0,5
Ceftizoxima	0,06	0,06	0,1
Ceftriaxona	0,1	0,5	0,5
Cefpiroma	1	2	0,5
Ceftazidima	8	32	4
Aztreonam	2	4	1
Carumonam	0,06	0,1	0,2
Temocilina	4	8	4
Cefoxitina	2	2	4
Cefotetan	1	2	2
Moxalactam	0,5	0,5	0,5
Imipenem	0,1	0,06	0,2
Meropenem	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
Gentamicina	0,5	0,5	1
Tobramicina	1	0,5	1
Amicacina	1	2	4
A. nalidixico	2	2	2
Ciprofloxacina	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
Fosfomicina	1	>128	0,5
Actividad enzimática <sup>a</sup>	1,21	1,57	1,40

<sup>a</sup>: mU/min/mg de proteína

**FIGURA 13.-** Grupo 1, Fenotipo SHV-2. El Epsilon-Test en la determinación de la CMI para una cepa de *Klebsiella pneumoniae* con una BIPEA de pI 7,6.



IP: imipenem; PP: piperacilina; CE: cefalotina; AM: ampicilina; FX: cefoxitina;  
AT: aztreonam; TZ: ceftazidima; CT: cefotaxima.

La modificación del inóculo de  $10^3$  a  $10^5$  y  $10^7$  UFC/depósito, en el estudio de sensibilidad de cepas seleccionadas por sus diferentes niveles de CMI, mostró una mayor influencia en aquellas con un perfil de tipo SHV-2 que en las de perfil SHV-6 (TABLAS 36 y 37). Un inóculo de  $10^7$  UFC/depósito en los aislamientos con BIPEA de tipo SHV-2 elevó de 4 a 8 veces el valor de la CMI para la cefotaxima, siendo menor el incremento observado para la ceftazidima y el aztreonam (factor 2-4). Para la cefpiroma el aumento fue variable: de 4 a 8 veces en aquellas con una única banda de 7,6 ó una de 7,6 y otra 5,4, y sólo 2 veces en las que presentaron una banda secundaria de pI 8,2 (*K. pneumoniae*) u otra de 8,8 (*E. gergoviae*). En los aislamientos del segundo grupo, SHV-6, el aumento fue más discreto: 2 veces para la cefotaxima y cefpiroma y ninguno para la ceftazidima y el aztreonam. En ambos grupos, SHV-2 y SHV-6, no se detectó aumento significativo de los valores de CMI para la cefoxitina. Por el contrario, el incremento del inóculo disminuyó, discretamente y en algunas cepas, la actividad del imipenem.

El estudio de sensibilidad con los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas contribuyó a la identificación de las BIPEA. La actividad de amoxicilina y piperacilina se incrementó con la asociación de 5  $\mu$ g/ml de ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam ó BRL 42715B (TABLAS 38 y 39). Todos los aislamientos con BIPEA de tipo SHV-2, a excepción de la cepa de *E. gergoviae*, mostraron unos

TABLA 36.- Grupo 1, fenotipo SHV-2: Efecto del incremento del inóculo en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Antibiótico	Perfil SHV-2							
	pI 7,6		pI 7,6 + 5,4			pI 7,6+8,2	pI 7,6+5,4+8,0	
	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.gergoviae</i>	
	36471/88	61407/91	40739/90	66877/90	50912/89	56513/90	63027/91	
Cefotaxima								
10 <sup>3a</sup>	8	32	1	0,5	32	4	32	
10 <sup>5</sup>	16	32	4	1	64	8	64	
10 <sup>7</sup>	128	128	16	4	>128	32	256	
Cefpiroma								
10 <sup>3</sup>	2	2	4	0,1	8	1	32	
10 <sup>5</sup>	8	4	4	0,1	16	2	32	
10 <sup>7</sup>	32	16	32	0,5	64	4	64	
Ceftazidima								
10 <sup>3</sup>	8	32	32	1	16	4	2	
10 <sup>5</sup>	32	64	32	1	16	32	4	
10 <sup>7</sup>	64	64	64	4	64	128	16	
Aztreonam								
10 <sup>3</sup>	2	16	32	0,5	8	1	2	
10 <sup>5</sup>	8	16	64	0,5	16	2	16	
10 <sup>7</sup>	16	32	256	2	32	8	32	
Cefoxitina								
10 <sup>3</sup>	2	4	2	2	4	4	8	
10 <sup>5</sup>	4	8	4	2	4	4	16	
10 <sup>7</sup>	8	8	4	2	8	8	32	
Imipenem								
10 <sup>3</sup>	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
10 <sup>5</sup>	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
10 <sup>7</sup>	0,5	0,5	0,1	0,1	0,5	0,1	0,5	

<sup>a</sup>: unidades formadoras de colonia por depósito.

valores de CMI para las asociaciones del ácido clavulánico y amoxicilina (8-32  $\mu\text{g/ml}$ ) y ácido clavulánico y piperacilina (1-32  $\mu\text{g/ml}$ ) sensiblemente inferiores a los obtenidos con el BRL 42715B (8-64 y 2-32  $\mu\text{g/ml}$ ), tazobactam (8-64 y 2-32  $\mu\text{g/ml}$ ) y sulbactam (16-128 y 16-128  $\mu\text{g/ml}$ ). Para la cepa de *E. gergoviae* la capacidad inhibitoria del BRL 42715B fue mayor que la del resto de los inhibidores. En los aislamientos con una BIPEA de tipo SHV-6, el ácido clavulánico y el BRL 42715B fueron los inhibidores más activos, siendo menor las diferencias entre el sulbactam y el tazobactam.

En los aislamientos con BIPEA de tipo SHV-2, el ácido clavulánico disminuyó de 5 a 9 diluciones la CMI de la cefotaxima y la cefpiroma; el tazobactam y el BRL 42715B de 4 a 9 y de

TABLA 37.- Grupo 1, fenotipo SHV-6: Efecto del incremento del inóculo en la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Antibiótico	Perfil SHV-6		
	PI 7,6		PI 7,6+7,1
	<i>E. coli</i> 30753/89	<i>K. pneumoniae</i> 5162/89	<i>E. coli</i> 65907/90
Cefotaxima			
10 <sup>3a</sup>	0,1	0,2	0,5
10 <sup>5</sup>	0,2	0,2	0,5
10 <sup>7</sup>	0,5	0,5	1
Cefpiroma			
10 <sup>3</sup>	1	0,2	0,2
10 <sup>5</sup>	1	2	0,5
10 <sup>7</sup>	2	4	1
Ceftazidima			
10 <sup>3</sup>	2	8	2
10 <sup>5</sup>	8	32	4
10 <sup>7</sup>	8	32	8
Aztreonam			
10 <sup>3</sup>	0,2	0,2	1
10 <sup>5</sup>	2	4	1
10 <sup>7</sup>	2	4	2
Cefoxitina			
10 <sup>3</sup>	2	2	2
10 <sup>5</sup>	2	2	4
10 <sup>7</sup>	2	4	4
Imipenem			
10 <sup>3</sup>	0,1	0,06	0,1
10 <sup>5</sup>	0,1	0,06	0,2
10 <sup>7</sup>	0,5	0,5	0,5

<sup>a</sup>: unidades formadoras de colonia por depósito

3 a 6 diluciones el sulbactam. Asociados a la ceftazidima o al aztreonam las diferencias fueron menores: de 3 a 8 diluciones de disminución con el ácido clavulánico y de 3 a 7 con el sulbactam, tazobactam o BRL 42715B. En los aislamientos con  $\beta$ lPEA de tipo SHV-6, los valores de CMI más bajos se obtuvieron con la asociación del ácido clavulánico con la cefotaxima y el BRL 42715B con la cefotaxima ( $\leq 0,01$ - $0,03 \mu\text{g/ml}$ ). No obstante, la mayor disminución se produjo al asociar el ácido clavulánico y la ceftazidima (5-7 diluciones) o el BRL 42715B y el aztreonam (4-6 diluciones). En ambos grupos, SHV-2 y SHV-6, la asociación del inhibidor no modificó los valores de CMI de la cefoxitina.



**TABLA 38.-** Grupo 1, fenotipo SHV-2: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) en asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (+ 5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Antibiótico + inhibidor	Perfil SHV-2					
	pI 7,6		pI 7,6 + 5,4		pI 7,6+8,2	pI 7,6+8,0+5,4
	<i>E. coli</i> (3)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>E. coli</i> (5)	<i>K. pneumoniae</i> (24)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>E. gergoviae</i> (1)
<b>Amoxicilina</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
+ CLV	8	16	8	16-32	16	512
+ SUL	16-128	32	16	32-128	32	256
+ TAZ	16-32	16	8	16-64	8	512
+ BRL	16-64	16	8	32-64	32	64
<b>Piperacilina</b>	512	512	1024->1024	1024->1024	512	>1024
+ CLV	1-2	8	16	8-32	32	64
+ SUL	8-32	64	32	16-128	64	32
+ TAZ	2-4	32	32	16-32	16	64
+ BRL	2-8	16	16	8-32	16	16
<b>Cefotaxima</b>	8-16	32	4-8	1-64	8	64
+ CLV	0,03	0,2	$\leq 0,01-0,03$	$\leq 0,01-2$	$\leq 0,01$	2
+ SUL	0,2-0,5	1	0,06-0,1	0,06-8	0,1	8
+ TAZ	0,03-0,06	0,5	0,06	$\leq 0,01-4$	0,06	4
+ BRL	0,03-0,1	0,5	0,03	0,03-4	0,01	4
<b>Cefpiroma</b>	8	4	4	0,1-16	2	32
+ CLV	0,01	0,06	0,03	0,03-4	$\leq 0,01$	1
+ SUL	0,5-1	0,2	0,1	0,1-0,5	0,2	2
+ TAZ	0,06-0,1	0,1	0,1	0,06-1	0,1	2
+ BRL	0,1	0,1	0,06-0,1	0,06-1	0,03	2
<b>Ceftazidima</b>	32	64	16-32	0,5-32	16	8
+ CLV	0,1	2	2-4	$\leq 0,01-2$	0,2	0,5
+ SUL	0,5-4	8	8-16	0,06-4	1	1
+ TAZ	0,2-1	4	4	0,06-2	0,5	1
+ BRL	0,2-1	4	2-8	0,03-4	0,5	1
<b>Aztreonam</b>	8	32	16	0,5-16	2	16
+ CLV	0,1	2	1-2	$\leq 0,01-0,5$	$\leq 0,01$	2
+ SUL	0,2-1	1	4	0,1-4	0,2	4
+ TAZ	0,1-0,2	1	4	0,06-2	0,1	2
+ BRL	0,5-1	2	2-4	0,03-2	0,03	2
<b>Cefoxitina</b>	2-4	8	2-4	2-8	4	16
+ CLV	2-4	8	4	4-8	4	32
+ SUL	2-4	8	4	2-8	4	16
+ TAZ	4	4	2	2-8	4	8
+ BRL	2-4	4	2	2-4	4	16

CLV: ácido clavulánico; SUL: sulbactam; TAZ: tazobactam; BRL: BRL 42715B.

**TABLA 39.-** Grupo 1, fenotipo SHV-6: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) en asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (+ 5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Antibiótico + inhibidor	Perfil SHV-6		
	pI 7,6		pI 7,6+7,1
	<i>E. coli</i> (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)
Amoxicilina	>1024	>1024	>1024
+ CLV	16	16	16
+ SUL	512	512	128
+ TAZ	128	512	64
+ BRL	32	32	4
Piperacilina	512	>1024	512
+ CLV	8	4	8
+ SUL	32	512	32
+ TAZ	32	512	16
+ BRL	16	16	8
Cefotaxima	0,2	0,2	0,5
+ CLV	0,03	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
+ SUL	0,06	0,06	0,06
+ TAZ	0,03	0,03	0,03
+ BRL	0,03	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
Cefpiroma	0,1	2	0,5
+ CLV	0,03	0,06	0,06
+ SUL	0,06	0,5	0,2
+ TAZ	0,06	0,5	0,1
+ BRL	0,06	0,1	0,06
Ceftazidima	8	32	4
+ CLV	0,2	0,2	0,2
+ SUL	2	8	1
+ TAZ	1	8	1
+ BRL	0,5	8	0,2
Aztreonam	2	4	1
+ CLV	0,1	0,1	0,06
+ SUL	0,2	0,5	0,1
+ TAZ	0,2	0,2	0,06
+ BRL	0,06	0,06	0,06
Cefoxitina	2	2	4
+ SUL	4	2	2
+ SUL	2	8	4
+ TAZ	4	4	4
+ BRL	2	--	4

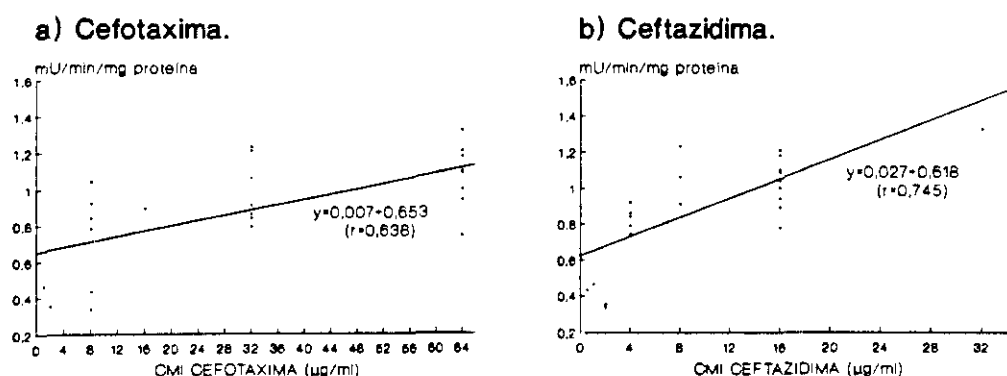
CLV: ácido clavulánico; SUL: sulbactam; TAZ: tazobactam;  
BRL: BRL 42715B.

#### 4.3.2.- Actividad enzimática específica.

La actividad enzimática específica de los extractos sonicados queda recogida, junto con los datos de CMI, en las TABLAS 34 y 35. Los extractos con una única enzima de tipo SHV-2 mostraron una actividad específica sensiblemente inferior (0,07-0,48 mU/min/mg proteína) a la obtenida con las del grupo SHV-6 (1,21-1,57 mU/min/mg). Asimismo, fue inferior a la observada con los extractos que presentaron una banda secundaria de pI 5,4, 8,2 u 8,8 (0,35-12,8 mU/min/mg) y a la de las cepas utilizadas como controles - *E. coli* J53(R1010) con una  $\beta$ -lactamasa SHV-1 (37,09 mU/min/mg) (34) y *E. cloacae* RYC11439/89-SDM con una  $\beta$ -lactamasa cromosómica establemente desreprimida (854,92 mU/min/mg) (468) -.

Es de resaltar, la buena correlación ( $r=0,745$ ) entre los valores de CMI para la ceftazidima en las 24 cepas de *K. pneumoniae* que mostraron una banda de 7,6 y otra de 5,4 y la actividad enzimática de sus extractos (FIGURA 14), objetivándose una mayor CMI a medida que aumenta la actividad enzimática. La correlación para la cefotaxima fue menor ( $r=0,638$ ). Este mismo hecho fue corroborado en 15 transconjugantes (pI 7,6 + 5,4) de estos aislamientos (datos no mostrados), si bien los coeficientes de correlación (0,552 para la ceftazidima y 0,427 para la cefotaxima) fueron inferiores.

**FIGURA 14.-** Grupo 1, fenotipo SHV-2: correlación entre la actividad enzimática y los valores de CMI de cefotaxima y ceftazidima en 24 cepas de *K. pneumoniae* (SHV-2 + TEM-1).



#### 4.3.3.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín.

La FIGURA 15 recoge el perfil de inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín de los extractos enzimáticos de 2 aislamientos clínicos, *E. coli* 36504/88 (pI 7,6) y *K. pneumoniae* 61407/91 (pI 7,6) representativos de aquéllos con un fenotipo de sensibilidad SHV-2 y del extracto enzimático de *E. coli* JC2926 (pBP60-1) con la  $\beta$ -lactamasa prototipo SHV-2 (279). El perfil de inhibición de los extractos enzimáticos de estas cepas fue superponible al obtenido con el extracto de la cepa de referencia con la enzima SHV-2. El sulbactam, tazobactam, cloxacilina, cefotaxima e imipenem determinaron una inhibición máxima superior al 80% (81-98%), siendo menor para el ácido clavulánico, aztreonam (72-83%), cefuroxima, cefoxitina (50-69%), ceftazidima, ceftibuten y cefotetan (8-16%) (datos de cloxacilina y cefotetan no representados). En todos ellos, las pendientes de las representaciones gráficas (FIGURA 15) fueron muy similares (diferencia inferior o igual a 0,2).

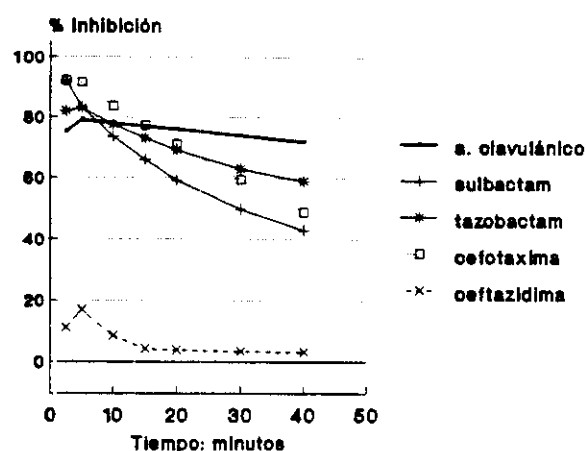
La FIGURA 16 representa el perfil de inhibición de los extractos de las cepas de *E. coli* J53(R1010) y *E. coli* C1A(pSLH47) con las enzimas SHV-1 (34) y SHV-6 (17), respectivamente, y del aislamiento clínico de *K. pneumoniae* 5162/89 con un fenotipo de sensibilidad de tipo SHV-6. El extracto enzimático de esta última cepa mostró un perfil similar al de SHV-1, SHV-2 y SHV-6 para ceftibuten y cefotetan. Asimismo, compartió valores de inhibición máxima y pendiente para la ceftazidima, aztreonam, cefoxitina e imipenem con SHV-1 y SHV-6 y cefuroxima con SHV-2. Con respecto al imipenem mostró un porcentaje de inhibición máximo similar al de SHV-2, pero con una pendiente muy diferente, 2,2 para la cepa de *K. pneumoniae* 5162/89 y 1,0 para el extracto con la enzima SHV-2. El porcentaje de inhibición máximo para la cefotaxima fue mayor en el extracto de la cepa 5162/89 (24,6%) y de la  $\beta$ -lactamasa SHV-6 (23,1%) que con la enzima SHV-1 (17,6%) y claramente menor que en el de SHV-2 (92,0%). Por otra parte, en el extracto de la cepa de *K. pneumoniae* 5162/89 los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa determinaron unos perfiles superponibles a los obtenidos con SHV-6, siendo ligeramente inferiores a los de SHV-1.

#### 4.3.4.- Transferencia de la resistencia y frecuencia de conjugación.

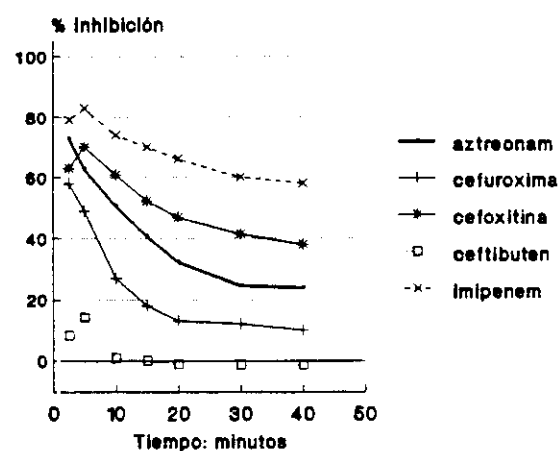
Con la excepción de la cepa de *K. pneumoniae* 5162/89 que mostró un perfil de tipo SHV-6, la resistencia a cefotaxima y ceftazidima fue siempre transferida por conjugación. En dicho aislamiento tampoco se consiguieron transformantes con resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación. En el resto de las cepas, los transconjugantes se obtuvieron con una frecuencia de conjugación entre  $10^{-4}$  y  $2 \times 10^{-7}$  (moda  $10^{-6}$ ), no objetivándose diferencias significativas entre las distintas especies de *Enterobacteriaceae*.

**FIGURA 15.-** Grupo 1, fenotipo SHV-2: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín en comparación con la BIPEA prototipo SHV-2.

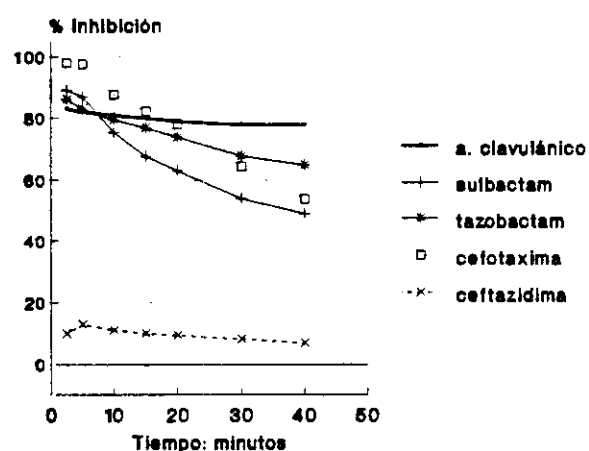
## SHV-2 (pl 7,6)



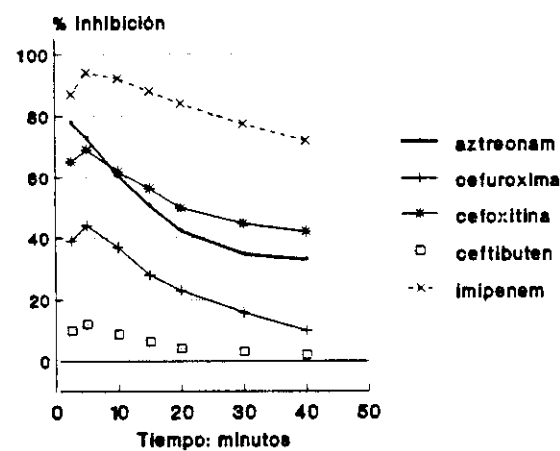
## SHV-2 (pl 7,6)



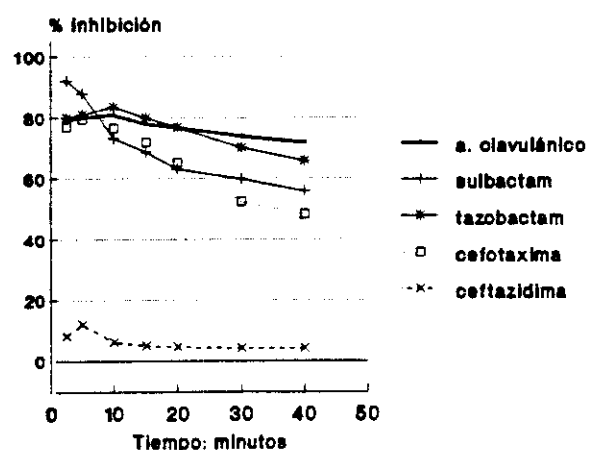
## 36504/88 (pl 7,6)



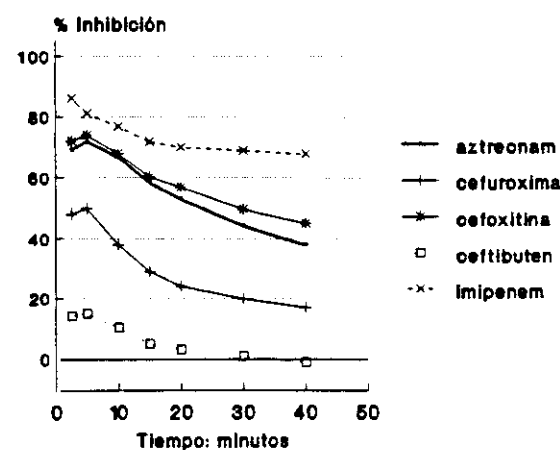
## 36504/88 (pl 7,6)



## 61407/91 (pl 7,6)

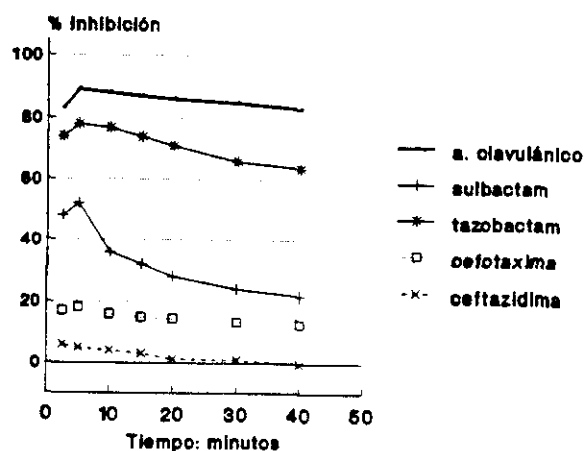


## 61407/91 (pl 7,6)

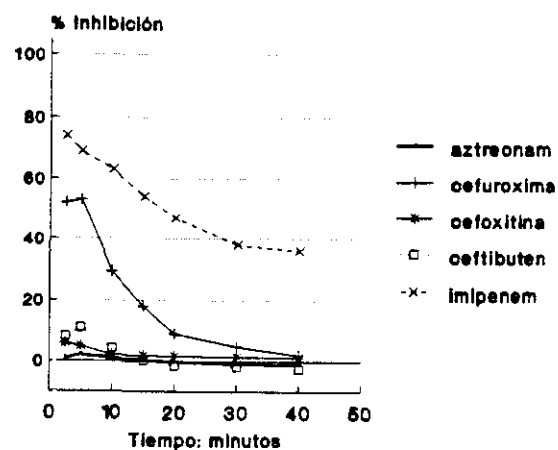


**FIGURA 16.-** Grupo 1, fenotipo SHV-6: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín en comparación con la  $\beta$ -lactamasas prototipos SHV-1 y SHV-6.

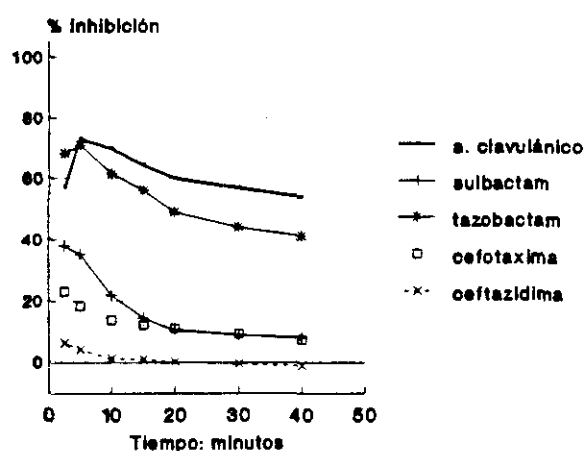
**SHV-1 (pl 7,6)**



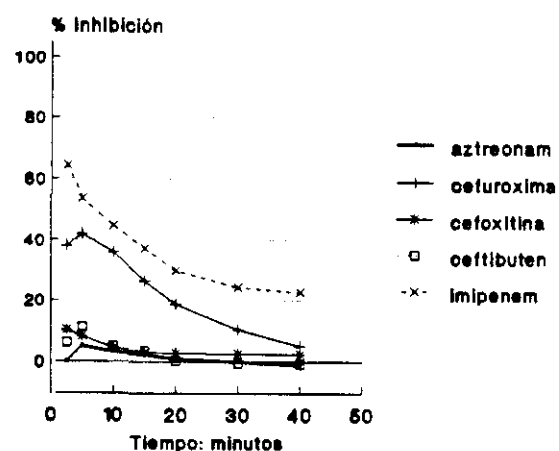
**SHV-1 (pl 7,6)**



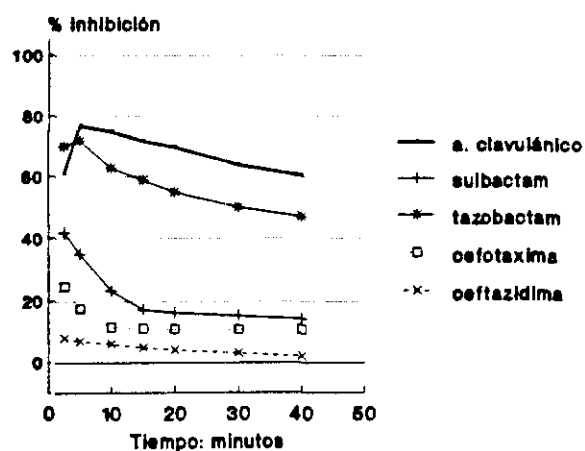
**SHV-6 (pl 7,6)**



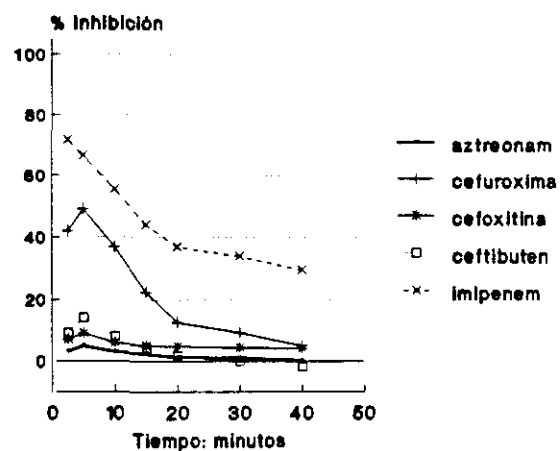
**SHV-6 (pl 7,6)**



**5162/89 (pl 7,6)**



**5162/89 (pl 7,6)**

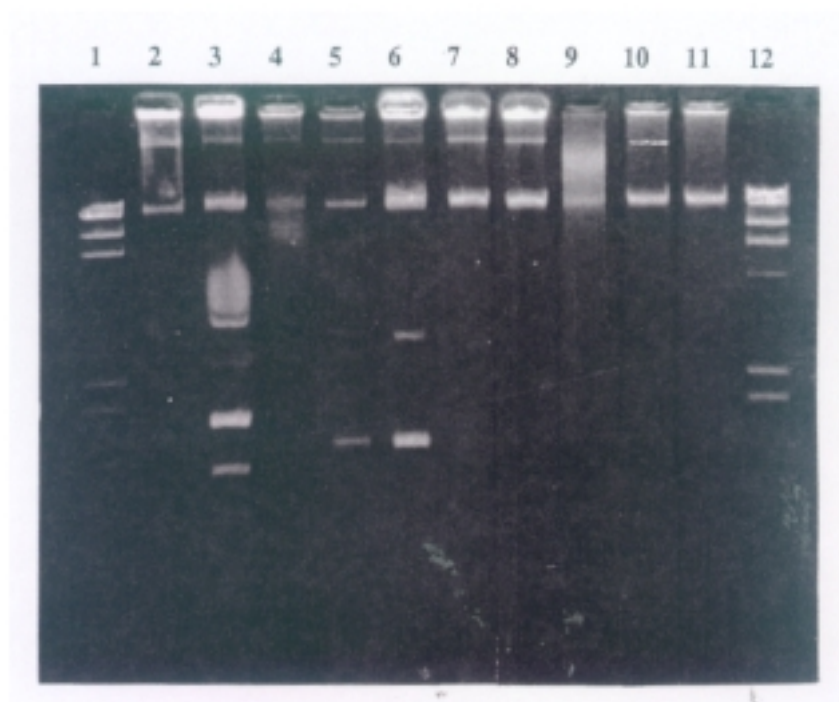


#### 4.3.5.- Análisis plasmídico e hibridación en colonia

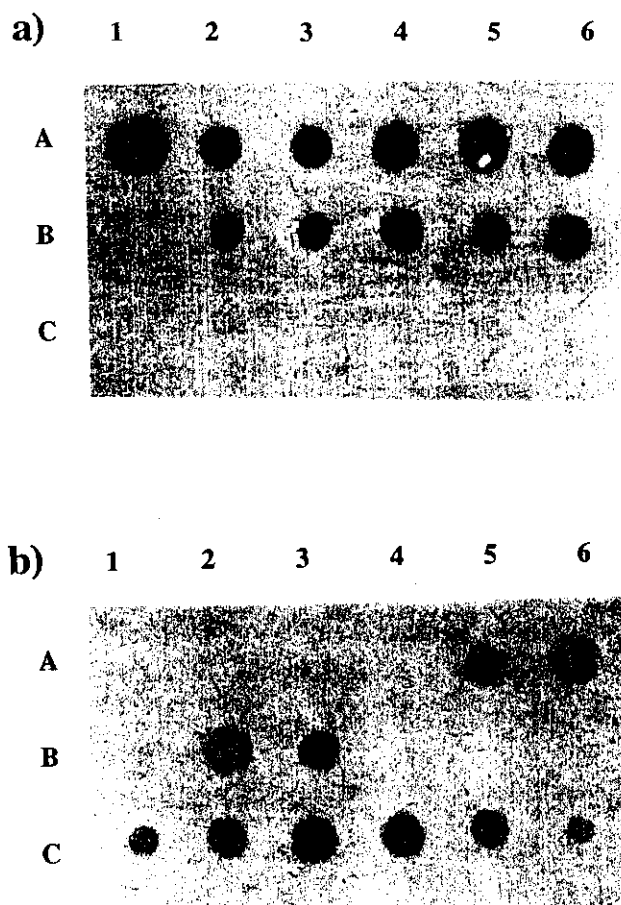
En todos los aislamientos con una  $\beta$ -lactamasas de pl 7,6, excepto en la *K. pneumoniae* 5162/89 en la que no se pudo transferir la resistencia por conjugación o transformación, se observó la presencia de plásmidos conjugativos de un tamaño superior a 180 Kb (datos de la medida de los plásmidos no mostrados) (FIGURA 17).

Por otra parte, se procedió a la hibridación en colonia con una sonda TEM, fragmento *SspI/PstI* de 560 pb del plásmido PBR322 (131), y otra SHV de 450 pb obtenida tras digestión del plásmido pHUC37 con *PstI/NotI* (406). En todos los aislamientos con perfil SHV-2 y SHV-6, incluida la cepa de *K. pneumoniae* 5162/89, se produjo una hibridación con la sonda SHV, siendo también positiva la hibridación con la sonda TEM en los aislamientos con una segunda banda de pl 5,4. En la FIGURA 18 se muestran algunas de estas hibridaciones.

**FIGURA 17.-** Grupo Análisis plasmídico en geles de agarosa 0,8%



Líneas: 1 y 12,  $\lambda$ /HindIII; 2, *E. coli* 36471/88 (SHV-2); 3, *E. coli* 40739/90 (SHV-2); 4, *K. pneumoniae* 40630/90 (SHV-2); 7, *K. pneumoniae* 61384/91 (SHV-2); 8, *K. pneumoniae* 61407/91 (SHV-2); 9, *E. coli* 40622/92 (SHV-2); 10, *K. pneumoniae* 40622/92 (SHV-2); 11, *K. pneumoniae* 5162/89 (SHV-6).

**FIGURA 18.-** Hibridación en colonia con sondas específicas de las familias SHV (a) y TEM (b).

1A, *E. coli* J53(pUD18)(SHV-3); 2A, *E. coli* JC2926(pBP60-1) (SHV-2); 3A, *E. coli* 36471/88 (SHV-2); 4A, *K. pneumoniae* 61407/91 (SHV-2); 5A, *E. coli* 40739/90 (SHV-2+TEM-1); 6A, *K. pneumoniae* 66877/90 (SHV-2+TEM-1).

1B, *E. coli* K12 BM21 (sin  $\beta$ -lactamasa de tipo TEM ó SHV); 2B, *K. pneumoniae* 50912/89 (SHV-2+TEM-1); 3B, *K. pneumoniae* 65951/92 (SHV-2+TEM-1); 4B, *E. coli* C1A(pSLH47) (SHV-6); 5B, *K. pneumoniae* 5162/89 (SHV-6); 6B, *E. coli* 30753/89 (SHV-6).

1C, *K. pneumoniae* CF104 (TEM-3); 2C, *S. arizonae* 36536/89 (TEM-6/8); 3C, *E. coli* 5H/89 (TEM-6/8+TEM-1); 4C, *E. coli* J53-2(pUD16) (TEM-4); 5C, *E. coli* 69350/89 (TEM-4); 6C, *E. coli* 15521/90 (TEM-pl 5,4).



#### 4.4.- Grupo 2.- $\beta$ IPEA de pI 5,9: Fenotipos TEM-6/8 y TEM-4.

El número de cepas que mostraron una banda de pI 5,9 fue de 36 e incluía 1 cepa de *E. cloacae*, 1 de *S. marcescens*, 9 de *E. coli* y 25 de *S. arizonae*, 24 de las cuales estuvo asociada a la única epidemia por  $\beta$ IPEA acaecida en nuestro hospital. Atendiendo al patrón de sensibilidad se diferenciaron dos subgrupos: a) el primero y más numeroso, 28 cepas, mostró un perfil de resistencia de tipo TEM-6 caracterizado por valores de CMI para la ceftazidima muy cercanos a los del aztreonam y claramente superiores a los de la cefotaxima. La enzima responsable de este fenotipo mostró similitud bioquímica con la  $\beta$ IPEA TEM-8, por ello nos referiremos a este subgrupo como perfil TEM-6/8; b) el segundo subgrupo, compatible con el perfil de resistencia descrito para TEM-4 (252,437), mostró unos valores de CMI para la ceftazidima, el aztreonam y la cefotaxima muy similares entre sí. El estudio genético confirmó la adscripción de estos dos subgrupos a enzimas de tipo TEM.

##### 4.4.1.- Perfil de sensibilidad y sinergia.

Los valores de CMI para la cefotaxima permitieron diferenciar fenotípicamente los dos subgrupos de  $\beta$ IPEA de pI 5,9 (TABLA 40), siendo más elevados en las de perfil TEM-4 (8-64  $\mu$ g/ml) que en las de perfil TEM-6/8 (0,5-8  $\mu$ g/ml). En los transconjugantes (datos no mostrados) se obtuvieron rangos menores, 8-16  $\mu$ g/ml para las de perfil TEM-4 y 0,5-2  $\mu$ g/ml para el resto. Es de resaltar que los aislamientos con perfil TEM-4 (incluyendo en el análisis el transconjugante de la cepa de *S. marcescens*) mostraron unos valores para la ceftazidima y la cefotaxima muy similares entre sí, 4-8  $\mu$ g/ml, mientras que en las de perfil TEM-6/8 la CMI de la cefotaxima (0,5-8  $\mu$ g/ml) fue de 4 a 8 diluciones menor que la de la ceftazidima (16-1024  $\mu$ g/ml), corroborándose estos resultados con la técnica del E-Test (FIGURA 19). Con las penicilinas, asociaciones de éstas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, metoxi- $\beta$ -lactámicos y carbapenems no se objetivaron diferencias entre las cepas de perfil TEM-4 y las de perfil TEM-6/8.

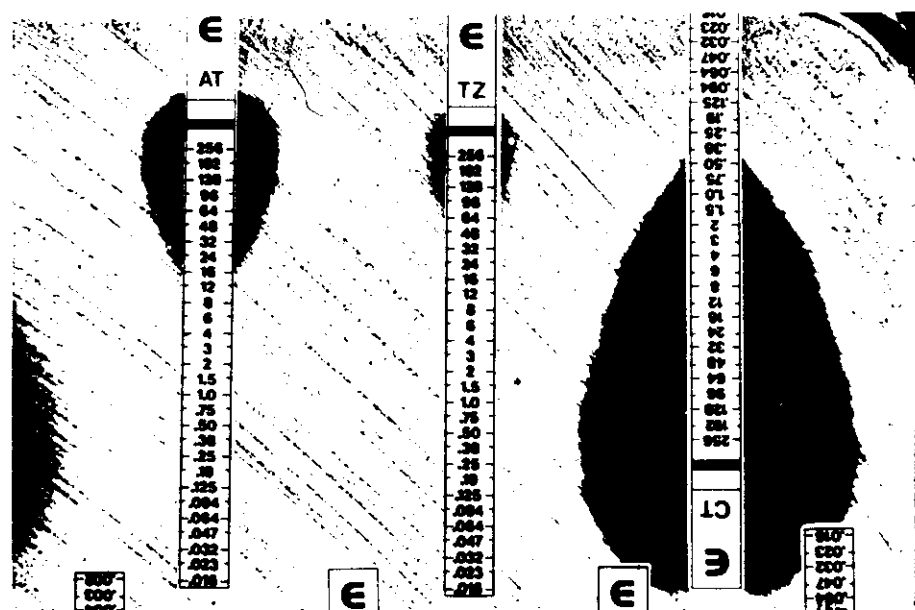
La modificación del inóculo en cepas seleccionadas por sus diferentes niveles de CMI, mostró una mayor influencia en los valores de CMI de la cefotaxima y la cefpiroma (3-4 diluciones) que en la ceftazidima (1-3 diluciones) (TABLA 41). Las CMI del aztreonam se vieron menos afectadas en las cepas con  $\beta$ IPEA de tipo TEM-4 que en las de perfil TEM-6/8. Los valores de cefoxitina no se modificaron en ninguno de los dos subgrupos y sólo en la cepa de *S. arizonae* la CMI del imipenem alcanzó un valor de 1  $\mu$ g/ml con un inóculo de  $10^7$  UFC/depósito.

**TABLA 40.-** Grupo 2, fenotipos TEM-6/8 y TEM-4: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) y actividad enzimática.

Antibiótico	Perfil TEM-6/8				Perfil TEM-4		
	pI 5,9	pI 5,9+5,4		pI 5,9+8,8	pI 5,9	pI 5,9+5,4	pI 5,9+8,0
	<i>S. arizonae</i> (25)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. cloacae</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> (6)	<i>S. marcescens</i> (1)
Ampicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Azlocilin	>1024	1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024
Piperacilina	512-1024	256	>1024	>1024	256	1024	>1024
Mazlocilina	1024->1024	256	>1024	>1024	512	1024->1024	>1024
Amox./clav.	8/4-16/8	4/2	16/8	>32/16	8/4	8/4-16/8	>32/16
Ticar./clav.	32/2->32/2	4/2	>32/2	>32/2	8/2	>32/2	>32/2
Piper./tazo.	16/2-32/4	4/0,5	16/2	>32/4	8/1	8/1-16/2	>32/4
Cefalotina	128-256	256	64	512	64	64-128	>512
Cefazolina	32-128	64	16	512	32	32	512
Cefuroxima	8-16	32	4	32	32	32-64	128
Cefotaxima	2-8	1	0,5	1	8	8	64
Ceftizoxima	1-2	1	0,5	1	8	4-8	64
Ceftriaxona	2-4	8	0,5	1	8	4-8	64
Cefpiroma	8-16	2	1	4	1	2-4	2
Ceftazidima	512-1024	16	64	128	4	4-8	4
Aztreonam	64-256	16	16	128	2	2-4	2
Carumonam	4-16	2	2	4	0,1	0,2-1	0,1
Temocilina	16-64	8	16	8	4	4-16	32
Cefoxitina	2-4	2	2	128	2	2-4	8
Cefotetan	0,2	0,2	0,2	32	1	0,2-1	8
Moxalactam	0,2-0,5	0,5	0,2	0,1	0,5	0,1	2
Imipenem	0,1-0,5	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1-0,2	0,2
Meropenem	$\leq 0,01-0,06$	0,03	$\leq 0,01$	0,06	0,03	$\leq 0,01-0,03$	0,06
Gentamicina	128->128	128	64	128	16	>128	32
Tobramicina	32-64	32	8	16	8	32-64	4
Amicacina	0,5-2	1	1	1	2	4-8	2
A. nalidixico	1-2	1	1	2	1	1	>64
Ciprofloxacina	$\leq 0,01-0,03$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,03	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	8
Fosfomicina	0,5-2	0,2	0,5	2	0,5	0,5-1	1
Actividad enzimática <sup>a</sup>	108 $\pm$ 0,57	1,59	2,16	2,85(0,97) <sup>b</sup>	1,25	1,73 $\pm$ 0,42	3,59(0,87) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: mU/min/mg de proteína; <sup>b</sup>: actividad enzimática del transconjugante pI 5,9.

**FIGURA 19.-** Grupo 2, fenotipo TEM-6/8: Detalle del Epsilon-Test en la determinación de la CMI de una cepa de *Salmonella arizonae* con una BIPEA de pI 5,9.



AT: aztreonam; TZ: ceftazidima; CT: cefotaxima.

El estudio con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas reveló un efecto sinérgico cuando se asociaron con amoxicilina, piperacilina, cefalosporinas de 3ª generación o aztreonam (TABLA 42). En los aislamientos con perfil TEM-6/8, 5  $\mu$ g/ml de sulbactam determinaron una menor reducción de los valores de CMI de amoxicilina y piperacilina que 5  $\mu$ g/ml de ácido clavulánico, BRL 42715B o tazobactam. Tomando como referencia los 25 aislamientos de *S. arizonae*, la disminución de la CMI de las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam fue menor con sulbactam (3-6 diluciones) que con clavulánico, tazobactam o BRL 42715B (6-10 diluciones). En las cepas con perfil TEM-4, a diferencia de las de perfil TEM-6/8, el BRL 42715B fue el inhibidor menos activo, confirmándose este efecto con las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam (TABLA 42).

#### 4.4.2.- Actividad enzimática específica.

En la TABLA 40 se muestran los valores medios de la actividad enzimática de los extractos con BIPEA de pI 5,9. En las cepas de *S. arizonae* el valor medio fue de 1,08 mU/min/mg proteína (rango 0,61-3,29). La presencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica en las cepas de *E. cloacae* y *S. marcescens* elevó el valor de la actividad enzimática a 2,85 y 3,59 mU/min/mg, respectivamente, siendo menores los valores obtenidos con sus transconjugante, 0,97 y 0,87 mU/min/mg.

TABLA 41.- Grupo 2, fenotipos TEM-6/8 y TEM-4: Efecto del incremento del inóculo.

Antibiótico	Perfil TEM-6/8				Perfil TEM-4		
	pI 5,9		pI 5,9+5,4	pI 5,9+8,8	pI 5,9	pI 5,9+5,4	pI 5,9+8,0
	<i>S. arizonae</i> 36536/89	<i>S. arizonae</i> 11H/89	<i>E. coli</i> 5H/89	<i>E. cloacae</i> 39737/89	<i>E. coli</i> 10205/89	<i>E. coli</i> 69350/89	<i>S. marcescens</i> 51140/90
<b>Cefotaxima</b>							
10 <sup>3a</sup>	2	4	0,2	1	4	8	32
10 <sup>5</sup>	2	4	0,5	1	8	8	64
10 <sup>7</sup>	64	32	4	32	>128	128	128
<b>Cefpiroma</b>							
10 <sup>3</sup>	4	8	1	1	1	0,5	1
10 <sup>5</sup>	8	16	1	4	1	2	2
10 <sup>7</sup>	32	32	32	64	16	16	4
<b>Ceftazidima</b>							
10 <sup>3</sup>	256	512	32	64	2	4	4
10 <sup>5</sup>	512	1024	64	128	4	4	4
10 <sup>7</sup>	1024	>1024	>512	512	4	8	16
<b>Aztreonam</b>							
10 <sup>3</sup>	16	128	16	32	1	2	2
10 <sup>5</sup>	64	256	16	128	2	4	2
10 <sup>7</sup>	>512	>512	256	512	4	4	8
<b>Cefoxitina</b>							
10 <sup>3</sup>	2	4	2	64	2	2	4
10 <sup>5</sup>	2	4	2	128	2	2	8
10 <sup>7</sup>	4	4	4	128	8	2	8
<b>Imipenem</b>							
10 <sup>3</sup>	0,06	0,5	0,06	0,2	0,1	0,1	0,2
10 <sup>5</sup>	0,2	0,5	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
10 <sup>7</sup>	1	1	0,2	2	0,5	0,5	0,5

<sup>a</sup>: unidades formadoras de colonia por depósito.

#### 4.4.3.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín.

El perfil de inhibición del extracto enzimático del transformante de la cepa de *S. arizonae* 36536/89 (Tf-36536/89) con pI 5,9 se representa comparativamente en la FIGURA 20 con el de las cepas de *E. coli* TEM-6 A15R<sup>+</sup> HB114-5748 (42) y *E. coli* TEM-8 BM2929 (322,324). Los porcentajes máximos de inhibición de estos extractos fueron similares entre sí para el ácido clavulánico, 82,1% ± 2,9% (valor medio ± desviación típica); sulbactam, 89,2% ± 2,0%; tazobactam, 92,5% ± 3,6%; cloxacilina, 90,4% ± 3,4%; aztreonam, 37,4% ± 5,3%; e imipenem, 96,0% ± 1,3%. Por el contrario, TEM-6, TEM-8 y Tf-36536/89 se diferenciaron en los porcentajes de inhibición de cefoxitina y ceftazidima, máximos para TEM-6 (87,4% y 46,9%, respectivamente) y mínimos para Tf-36536/89 (30,2% y 1,6%). Por otra parte, los perfiles de cefotaxima y cefotetan fueron muy similares para TEM-6 y TEM-8 (83,8% y 85,2%), distanciándose claramente del Tf-36536/89 (38,8%). Con este último se obtuvo un perfil para cefuroxima superponible al de TEM-8.

**TABLA 42.-** Grupo 2, fenotipos TEM-6/8 y TEM-4: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) en asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (+  $5\mu\text{g/ml}$ )

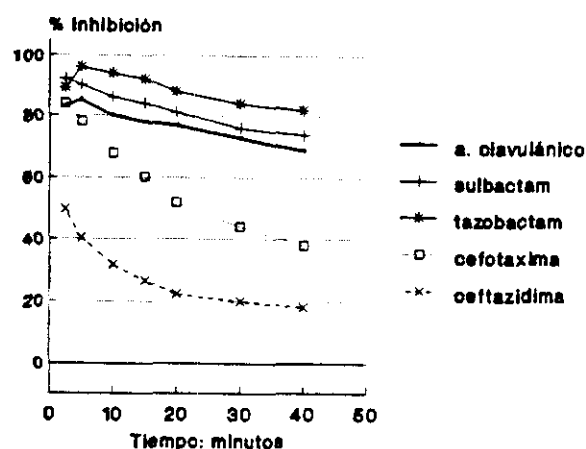
Antibiótico + inhibidor	Perfil TEM-6/8				Perfil TEM-4		
	pI 5,9	pI 5,9+5,4	pI 5,9+8,8		pI 5,9	pI 5,9+5,4	pI 5,9+8,0
	<i>S. arizonae</i> (25)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. cloacae</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> (6)	<i>S. marcescens</i> (1)
<b>Amoxicilina</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
+ CLV	16-31	16	16	>512	8	8-16	>512
+ SUL	64-512	128	512	>512	8	8-32	>512
+ TAZ	32-64	16	16	>512	8	8-16	>512
+ BRL	16-32	32	64	512	32	32-64	512
<b>Piperacilina</b>	512-1024	256	>1024	>1024	256	1024	>1024
+ CLV	2-8	2	4	4	1	2-8	64
+ SUL	4-32	8	128	128	2	8-16	16
+ TAZ	1-2	4	8	2	1	4-8	8
+ BRL	4-8	4	64	2	8	32	2
<b>Cefotaxima</b>	2-8	1	0,5	1	8	8	64
+ CLV	0,06-0,1	0,1	0,03	2	0,06	0,03	0,5
+ SUL	0,1-0,2	0,2	0,1	0,5	0,1	0,03	1
+ TAZ	0,06-0,2	0,06	0,06	2	0,1	0,01-0,03	1
+ BRL	0,03-0,2	0,1	0,03	1	2	2	2
<b>Cefpiroma</b>	8-16	2	1	4	1	2-4	2
+ CLV	0,1-0,2	0,03	0,1	0,2	<0,01	<0,01-0,06	0,1
+ SUL	1-2	0,2	0,5	1	<0,01	<0,01-0,06	0,1
+ TAZ	0,1-0,5	0,06	0,1	0,1	<0,01	<0,01-0,06	0,1
+ BRL	0,1-0,5	0,2	0,1	0,06	0,1	0,5	2
<b>Ceftazidima</b>	512-1024	16	64	128	4	4-8	4
+ CLV	0,1-1	0,5	1	2	0,03	0,06-0,1	0,5
+ SUL	4-16	2	8	32	0,06	0,06-0,2	0,5
+ TAZ	0,2-1	1	1	0,5	0,03	0,06-0,1	0,2
+ BRL	1-4	0,5	2	0,06	0,1	0,5	2
<b>Aztreonam</b>	64-256	16	16	128	2	2-4	2
+ CLV	0,5-2	0,06	1	8	0,03	0,06	0,2
+ SUL	16-32	8	8	4	0,06	0,06-0,1	0,5
+ TAZ	0,5-1	0,03	0,2	1	0,03	0,03-0,1	0,2
+ BRL	1-4	0,5	2	1	0,1	0,2-0,5	1
<b>Cefoxitina</b>	2-4	2	2	128	2	2-4	8
+ CLV	2	2	2	>128	2	2	64
+ SUL	2-4	2	2	64	2	2	16
+ TAZ	2-4	2	2	64	2	2	8
+ BRL	2-4	2	2	4	2	2-4	2

CLV: ácido clavulánico; SUL: sulbactam; TAZ: tazobactam; BRL: BRL 42715B.

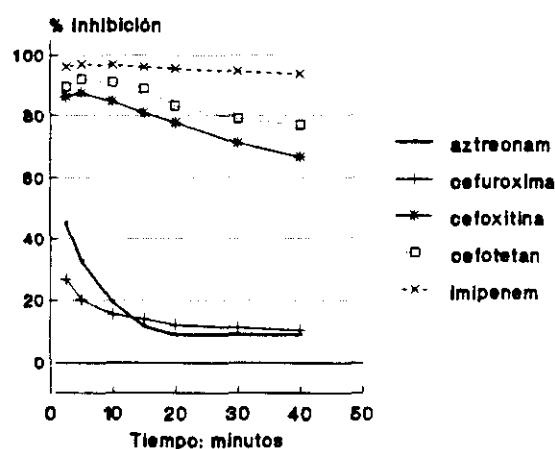
Los extractos enzimáticos de las cepas de *E. coli* TEM-LM, TEM-17 y TEM-4 (FIGURAS 21 y 22), con igual (5,4) pI y diferente fenotipo de resistencia, mostraron un perfil similar al del transformante Tf-36536/89, excepto para el sulbactam, tazobactam, ceftazidima y aztreonam. El perfil de inhibición de TEM-3 fue, salvo para cefotaxima y cefotetan, indistinguible del de TEM-4. Asimismo, el perfil de TEM-4 fue superponible al obtenido con los extractos del transformante de la cepa de *E. coli* 69350/89 y del tranconjugante de la de *S. marcescens* 51140/90. Estas cepas sólo fueron similares a TEM-LM y TEM-17 en los perfiles del tazobactam, ceftazidima y cefuroxima.

**FIGURA 20.-** Grupo 2, fenotipo TEM-6/8: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín en comparación con las BIPEA prototipos TEM-6 y TEM-8.

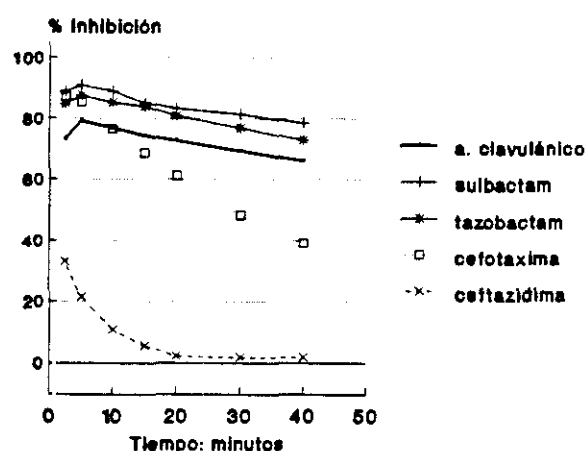
**TEM-6 (pl 5,9)**



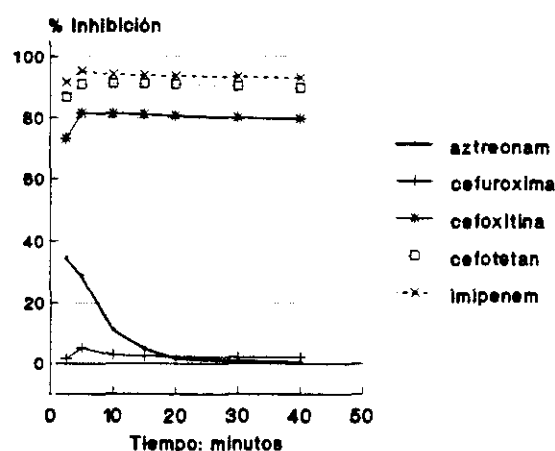
**TEM-6 (pl 5,9)**



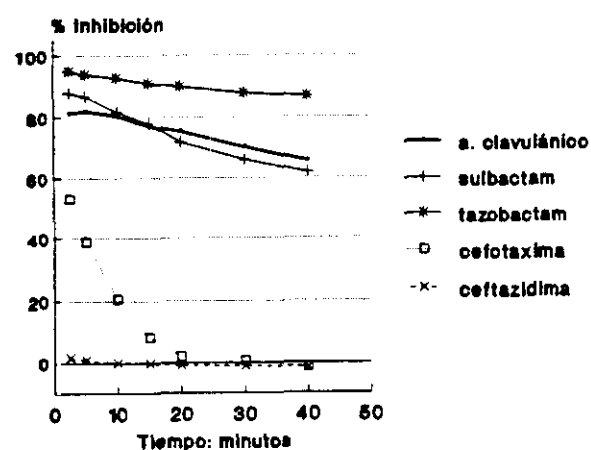
**TEM-8 (pl 5,9)**



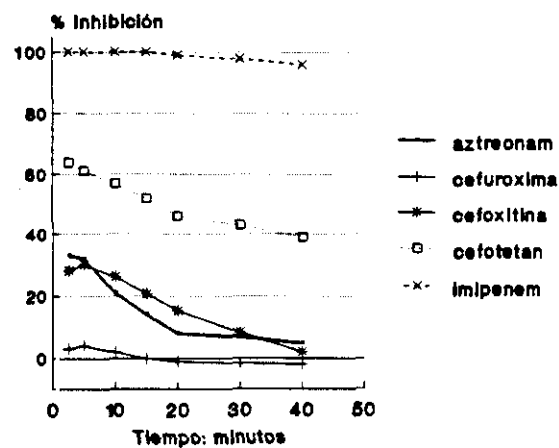
**TEM-8 (pl 5,9)**



**Tf-36536/89 (pl 5,9)**

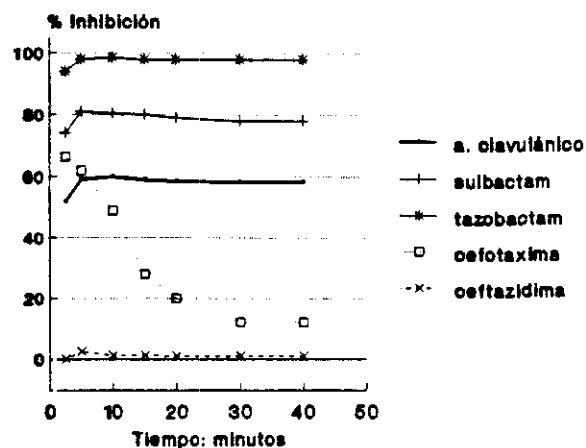


**Tf-36536/89 (pl 5,9)**

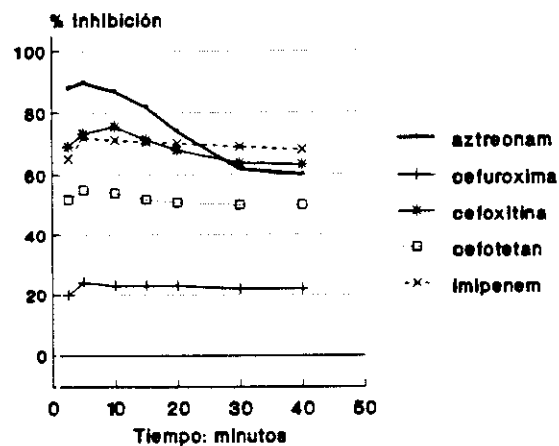


**FIGURA 21.-** Grupo 2, fenotipo TEM-4: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín en comparación con las BIPEA prototipos TEM-3 y TEM-4.

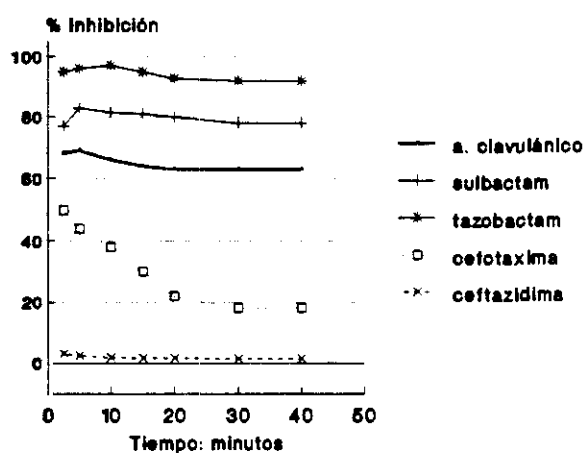
**TEM-3 (pl 6,3)**



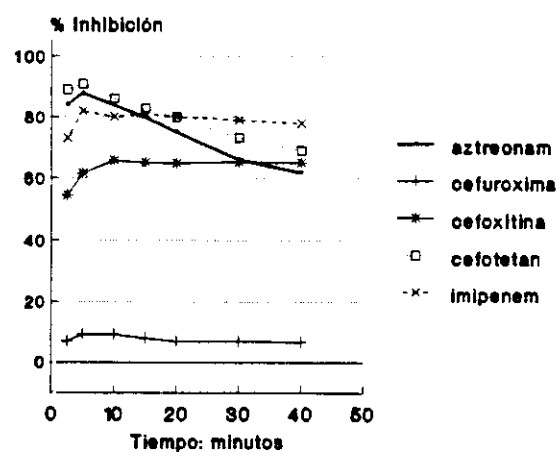
**TEM-3 (pl 6,3)**



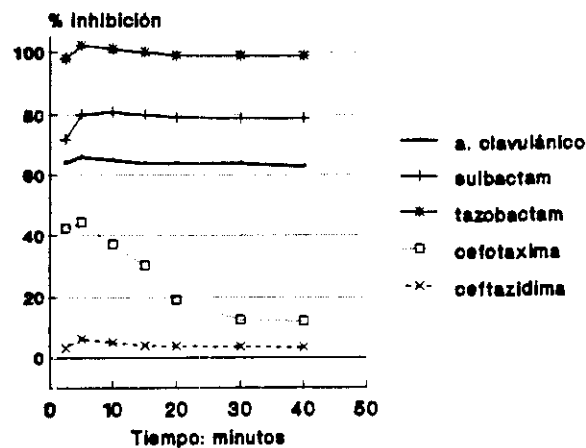
**TEM-4 (pl 5,9)**



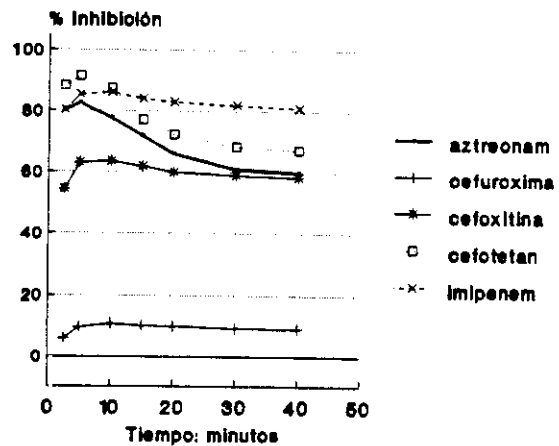
**TEM-4 (pl 5,9)**



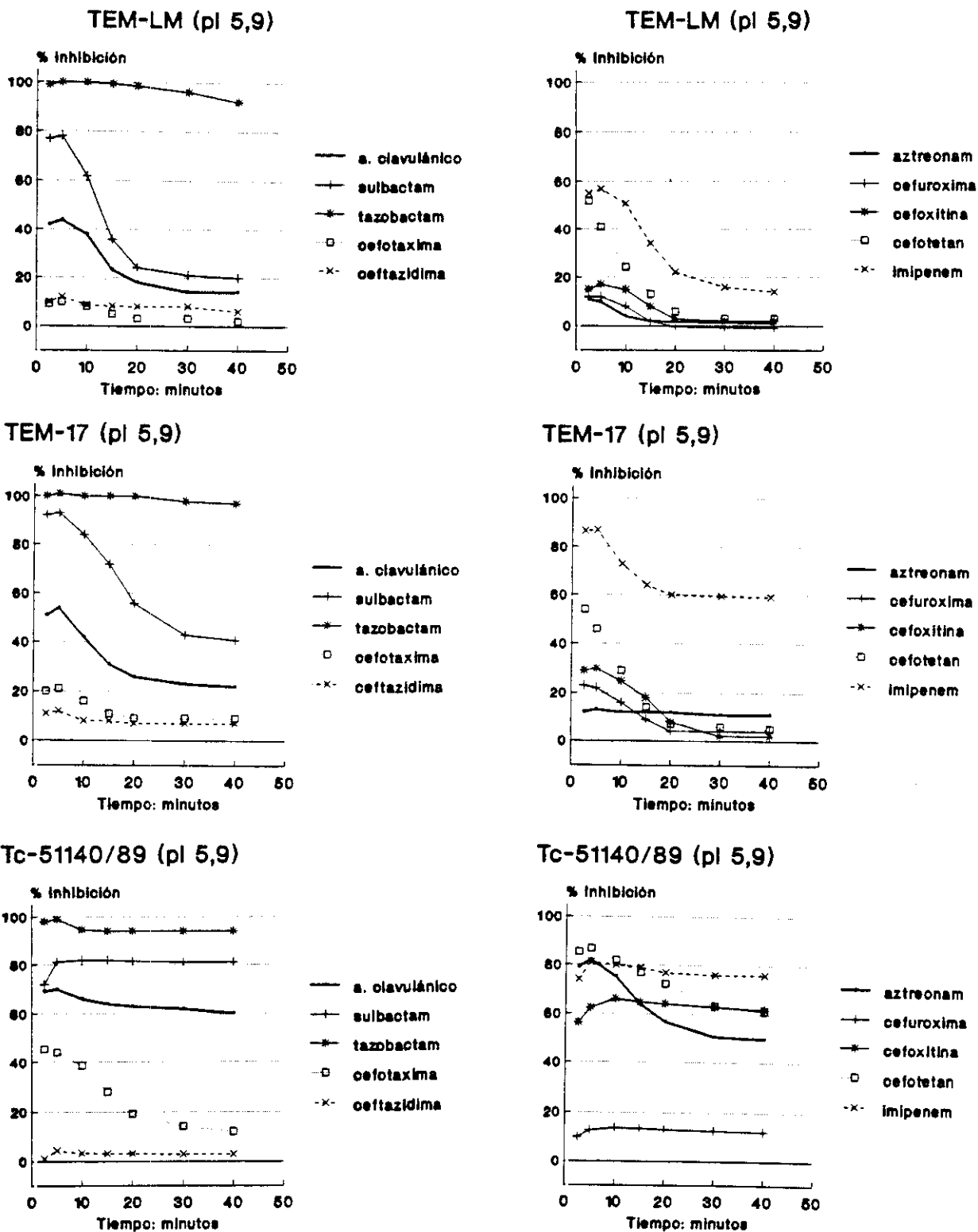
**Tf-69350/89 (pl 5,9)**



**Tf-69350/89 (pl 5,9)**



**FIGURA 22.-** Grupo 2, fenotipo TEM-4: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitroceftín en comparación con las  $\beta$ -lactamasas prototipos TEM-LM y TEM-17.





#### 4.4.4.- Transferencia de la resistencia y frecuencia de conjugación.

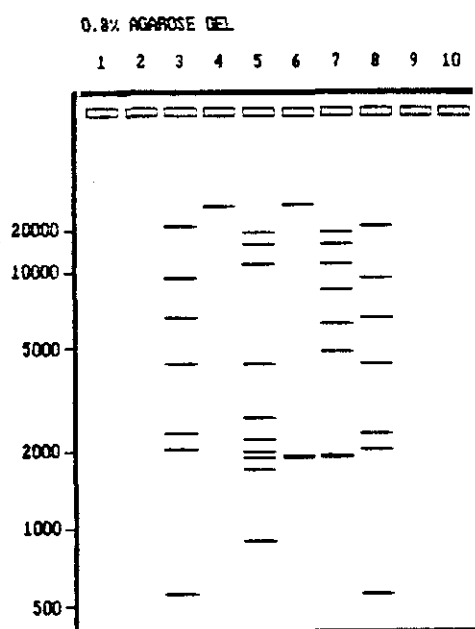
En este grupo se obtuvieron transconjugantes resistentes a la cefotaxima y la ceftazidima en todos los aislamientos, evidenciándose una frecuencia de conjugación de rango  $2 \times 10^{-5}$ – $4 \times 10^{-8}$  (moda  $10^{-7}$ ).

#### 4.4.5.- Análisis plasmídico e hibridación en colonia.

En todos los aislamientos con BIPEA de pI 5,9 se demostró la existencia de plásmidos conjugativos. En las cepas de *S. arizonae* aisladas en la epidemia por BIPEA, se asoció la resistencia a ceftazidima con un plásmido, pRYC36536, de tamaño aproximado de 59 Kb (FIGURA 23). Asimismo, en los controles epidemiológicos realizados en la Unidad de Cardiología Pediátrica, donde se produjo la epidemia, se aisló a partir de las heces de un paciente, una cepa de *E. coli* que presentaba dos plásmidos con tamaño aproximado de 63 (pRYC5H) y 2 Kb. El primero de ellos codificaba simultáneamente la BIPEA de pI 5,9 y otra  $\beta$ -lactamasa de pI 5,4 (TEM-1).

La hibridación con sondas específicas de tipo TEM, fragmento *SspI/PstI* de 560 pb del plásmido PBR322 (131), y SHV, fragmento *PstI/NorI* de 450 pb del plásmido pHUC37 (406), confirmó la adscripción de estas enzimas a las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM (FIGURA 18).

**FIGURA 23.-** Grupo 2: Representación de la digestión de los plásmidos pRYC36536 y pRYC5H portadores de la BIPEA de pI 5,9 (TEM-6/8).



Líneas: 3 y 8,  $\lambda$ /HindIII; 4, pRYC36536 (*S. arizonae* 36536/89); 5, p36536/89 /EcoRI; 6, pRYC5H (*E. coli* 5H/89); 7, pRYC 5H/89 /EcoRI.

#### 4.5.- Grupo 3.- BIPEA de pI 5,4.

Este tercer grupo se observó en 6 cepas de *E. coli* aisladas de la orina de 3 pacientes no relacionados entre sí. Obviamente, la diferenciación entre la BIPEA de pI 5,4 y TEM-1 no fue posible por isoelectroenfoque, la sinergia con el ácido clavulánico en la prueba de doble difusión por disco, ausente en TEM-1, y su particular fenotipo de resistencia transferible nos permitió su individualización.

##### 4.5.1.- Perfil de sensibilidad y sinergia.

El fenotipo de resistencia de los 6 aislamientos y sus respectivos transconjugantes queda recogido, junto con el de la cepa de referencia de *E. coli* productora de TEM-1, en la TABLA 43. En las cepas con la BIPEA de pI 5,4 y en sus respectivos transconjugantes se observó, comparativamente con TEM-1 una elevación de 16 a 64 veces de los valores de CMI para la cefazolina, cefalotina y cefuroxima; de 4 a 64 veces para las cefalosporinas de 3ª generación y de 64 a 128 para el aztreonam. Comparativamente con TEM-1 y otras BIPEA, se observó un incremento de las CMI de la temocilina, cefoxitina, cefotetan y moxalactam (TABLAS 32-35,40 y 43).

El incremento del inóculo estudiado con la cepa de *E. coli* 15521/90, y su transconjugante objetivó una menor afectación de los valores de CMI de la cefotaxima que el obtenido con la cepa de referencia con la enzima TEM-1 (TABLA 44). La elevación de los valores de CMI de la ceftazidima para ambas enzimas, BIPEA de pI 5,4 y TEM-1, fue de 4 diluciones, no afectándose apenas los de la cefpiroma y el aztreonam.

La adición de 5 µg/ml de ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam o BRL 42715B a la amoxicilina o piperacilina determinó un menor efecto en las cepas con BIPEA de pI 5,4 respecto de TEM-1, siendo el sulbactam el inhibidor menos activo (TABLA 45). La asociación del BRL 42715B con cualquiera de las cefalosporinas de 3ª generación o el aztreonam determinó el rango de CMI con límites más bajos, 0,03-0,5 µg/ml, siendo el del ácido clavulánico, 0,03-1 µg/ml, tazobactam, 0,06-1 µg/ml, y sulbactam, 0,1-2 µg/ml. Coincidente con lo descrito con las cepas con BIPEA de pI 7,6 y 5,9, la adición de 5 µg/ml del inhibidor no modificó los valores de CMI de la cefoxitina.

TABLA 43.- Grupo 3, BIPEA de pI 5,4: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) y actividad enzimática.

Antibiótico	Perfil TEM-derivada		TEM-1
	pI 5,4		pI 5,4
	<i>E. coli</i> (6)	transconjugantes (6)	<i>E. coli</i> (R6K)
Ampicilina	>1024	>1024	>1024
Piperacilina	512	512	256
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	512->1024	>1024	>1024
Azlocilin	512	---	---
Mezlocilina	256	---	---
Amox./clav.	32/16	16/8	8/4
Piper./tazo.	8/1->32/4	8/1-16/8	4/0,5
Ticar./clav.	8/2->32/2	---	32/2
Cefalotina	256-512	---	32
Cefazolina	64-256	64-128	4
Cefuroxima	16-32	16-32	4
Cefotaxima	0,5-1	0,5-2	0,03
Ceftizoxima	1	---	0,03
Ceftriaxona	0,1-2	0,2-2	0,03
Cefpiroma	0,5-2	0,5-2	0,06
Ceftazidima	4-8	2-8	0,1
Aztreonam	2	1-2	<0,01
Carumonam	0,1-1	---	<0,01
Temocilina	4-8	4-8	4
Cefoxitina	8-16	8-32	4
Cefotetan	1-4	---	0,06
Moxalactam	1-2	---	0,06
Imipenem	0,1	0,06-0,1	0,06
Meropenem	$\leq 0,01-0,06$	0,03	<0,01
Biapenem	0,03-0,06	---	<0,01
Gentamicina	0,5-1	0,5-1	---
Tobramicina	2-4	1-2	---
Amicacina	2-4	0,2-0,5	---
A. nalidixico	1->64	>64	---
Ciprofloxacina	$\leq 0,01-4$	---	---
Fosfomicina	2-16	---	---
Actividad enzimática <sup>a</sup>	2,08 $\pm$ 0,44	1,94 $\pm$ 0,59	0,46

<sup>a</sup>: mU/min/mg de proteína.

TABLA 44.- Grupo 3, BIPEA de pI 5,4: Efecto del incremento del inóculo.

Antibiótico	Perfil TEM-derivada		TEM-1
	pI 5,4		pI 5,4
	<i>E. coli</i> 15521/90	transconjugante Tc-15521/90	<i>E. coli</i> (R6K)
Cefotaxima			
10 <sup>3a</sup>	0,5	0,5	0,03
10 <sup>5</sup>	0,5	1	0,03
10 <sup>7</sup>	1	1	0,1
Cefpiroma			
10 <sup>3</sup>	0,2	0,5	≤0,01
10 <sup>5</sup>	0,5	1	0,03
10 <sup>7</sup>	1	1	0,06
Ceftazidima			
10 <sup>3</sup>	4	4	0,03
10 <sup>5</sup>	4	8	0,06
10 <sup>7</sup>	16	16	0,1
Aztreonam			
10 <sup>3</sup>	2	1	≤0,01
10 <sup>5</sup>	2	1	0,03
10 <sup>7</sup>	2	2	0,03
Cefoxitina			
10 <sup>3</sup>	8	2	2
10 <sup>5</sup>	8	4	2
10 <sup>7</sup>	16	4	4
Imipenem			
10 <sup>3</sup>	0,03	0,03	0,06
10 <sup>5</sup>	0,1	0,03	0,06
10 <sup>7</sup>	0,1	0,06	0,1

<sup>a</sup>: unidades formadoras de colonias por depósito.

#### 4.5.2.- Actividad enzimática específica.

La actividad enzimática específica, recogida en la TABLA 43, fue similar en los extractos de las cepas clínicas y en el de sus respectivos transconjugantes ( $2,08 \pm 0,44$  y  $1,94 \pm 0,59$  mU/min/mg proteína), siendo superior a la detectada para TEM-1 (0,46 mU/min/mg).

#### 4.5.3.- Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín.

En las FIGURAS 24 y 25 se recoge el perfil de inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín de los extractos enzimáticos de *E. coli* 15521/90 y *E. coli* 47676/90 en comparación con los de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1, IRT-3, TEM-7 y TEM-Ha1, todas ellas de pI 5,4. Las cepas 15521/90 y 47676/90, representativas del resto de los aislamientos clínicos con BIPEA de pI 5,4, mostraron un perfil similar; no obstante el extracto enzimático de la cepa de *E. coli* 47676/90 determinó un

**TABLA 45.-** Grupo 3, BIPEA de pI 5,4: Perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ) en asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (+ 5 $\mu\text{g/ml}$ ).

Antibiótico + inhibidor	Perfil TEM-derivada		TEM-1
	pI 5,4		pI 5,4
	<i>E. coli</i> (6)	transconjugantes (6)	<i>E. coli</i> (R6K)
<b>Amoxicilina</b>	>1024	>1024	>1024
+ CLV	32-64	16-64	8
+ SUL	64-128	64-128	16
+ TAZ	64	32-64	8
+ BRL	32-64	32	8
<b>Piperacilina</b>	512	512	256
+ CLV	1-4	1-8	2
+ SUL	4-16	4-16	4
+ TAZ	4-8	4-16	4
+ BRL	1-2	2-8	2
<b>Cefotaxima</b>	0,5-1	0,5-2	0,03
+ CLV	0,2	0,1-0,2	$\leq 0,01$
+ SUL	0,2-0,5	0,1-0,5	0,03
+ TAZ	0,2	0,1-0,2	$\leq 0,01$
+ BRL	0,1-0,2	0,1	$\leq 0,01$
<b>Cefpiroma</b>	0,5-2	0,5-2	$\leq 0,01$
+ CLV	0,1	0,06-0,1	$\leq 0,01$
+ SUL	0,1	0,1-0,2	$\leq 0,01$
+ TAZ	0,06	0,1	$\leq 0,01$
+ BRL	0,06-0,1	0,06-0,2	$\leq 0,01$
<b>Ceftazidima</b>	4-8	2-8	0,06
+ CLV	0,1-1	0,06-1	0,03
+ SUL	0,1-2	0,5-2	0,06
+ TAZ	0,2-2	0,1-1	0,06
+ BRL	0,1-0,5	0,06-0,5	0,06
<b>Aztreonam</b>	2	1-2	0,03
+ CLV	0,1-0,5	0,03-0,2	$\leq 0,01$
+ SUL	1-2	0,5-1	0,03
+ TAZ	0,1-2	0,06-0,5	0,03
+ BRL	0,1-0,2	0,03-0,1	$\leq 0,01$
<b>Cefoxitina</b>	8-16	8-32	2
+ CLV	8-16	8-32	2
+ SUL	8-16	8-32	2
+ TAZ	16	8-32	2
+ BRL	8-16	8	1

CLV: ácido clavulánico; SUL: sulbactam; TAZ: tazobactam;  
BRL: BRL 42715B.

porcentaje de inhibición máximo un 10% más elevado para la cefotaxima, ceftazidima y cefoxitina que el obtenido con el de *E. coli* 15521/90. Con independencia de ello, las pendientes fueron similares, 1,9, 0,8 y 1,8, respectivamente. El perfil para el ceftibuten y el cefotetan, no representado en las figuras, fue también similar en ambos casos.

Es de resaltar que en ambos aislamientos, el porcentaje máximo de inhibición para el ácido clavulánico se produjo a los 10 minutos de comenzado el ensayo y no a los 2 ó 5 minutos como es

habitual, siendo equiparable a lo observado con la  $\beta$ -lactamasa IRT-3 resistente a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa. En este caso el porcentaje máximo fue del 10,6% frente al 48,9% y 54,3% de los extractos de las cepas de *E. coli* 15521/90 y *E. coli* 47676/90, y del 97,4% para la enzima TEM-1. TEM-7 mostró para el ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y cloxacilina unos porcentajes de inhibición más altos que los obtenidos con la enzima TEM-1 o los extractos de las cepas con BIPEA de pl 5,4. El porcentaje máximo de inhibición para el aztreonam (16-22,5%) sólo fue equiparable al obtenido con la enzima TEM-7 (12,5%), mientras que para la cefuroxima (16,3%-9,3%) el parecido fue mayor con el de TEM-1 (17,2%) y la TEM-Ha1 (9,3%). Con respecto a la cefoxitina, el perfil de inhibición difirió del resto de las  $\beta$ -lactamasas, ocupando un lugar intermedio entre TEM-1, IRT-3 y TEM-Ha1, que mostraron valores menores (12,4-29,8%) y TEM-7 en los que el porcentaje máximo de inhibición fue superior al 80%. Para cefotaxima y ceftazidima estos porcentajes máximos fueron mayores a los obtenidos con TEM-1, IRT-3 y TEM-Ha1 y sólo comparables a los obtenidos con TEM-7, si bien las pendientes fueron mucho más altas en esta última. Por último, con el imipenem el perfil fue similar en todos los extractos enzimáticos menos en la IRT-3, que fue sensiblemente menor.

#### 4.5.4.- Transferencia de la resistencia y frecuencia de conjugación.

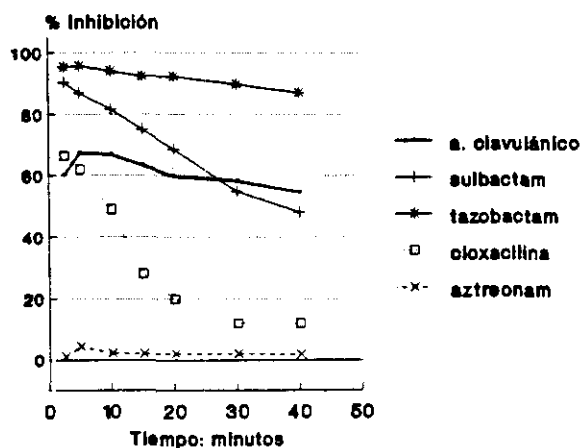
Las 6 cepas de *E. coli* con la BIPEA de pl 5,4 transfirieron la resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y al aztreonam, obteniéndose transconjugantes con una frecuencia de conjugación entre  $3,1 \times 10^{-6}$  y  $10^{-7}$  (moda  $10^{-6}$ ).

#### 4.5.5.- Análisis plasmídico e hibridación en colonia.

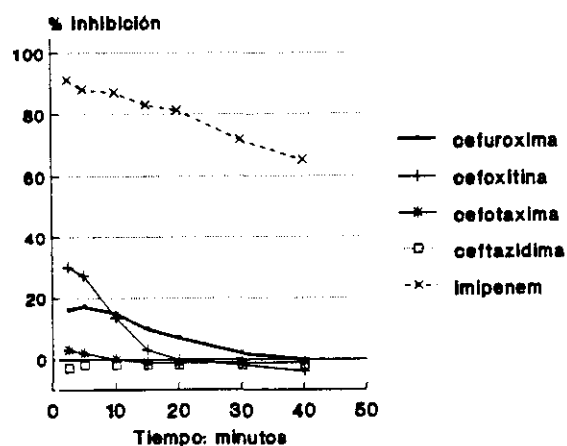
En todas las cepas clínicas con BIPEA de pl 5,4 se detectó la presencia de plásmidos conjugativos, siendo positiva la hibridación en colonia con la sonda específica de tipo TEM (fragmento *SspI/PstI* del PBR322) (131) y negativa con la sonda específica de tipo SHV (fragmento *PstI/NotI* del pHUC37) (406) (FIGURA 18).

**FIGURA 24.-** Grupo 3, BIPEA de pl 5,4: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín en comparación con las  $\beta$ -lactamasas prototipos TEM-1 e IRT-3.

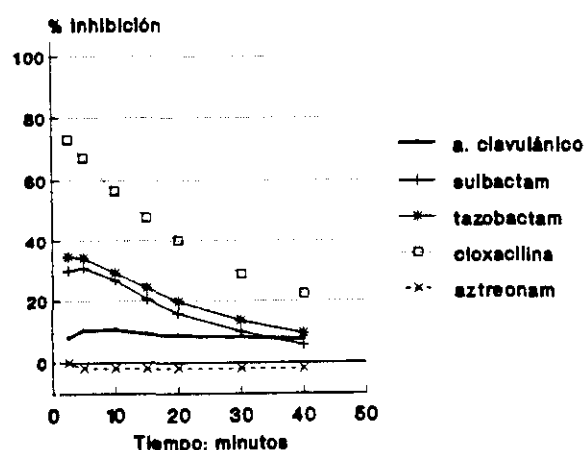
## TEM-1 (pl 5,4)



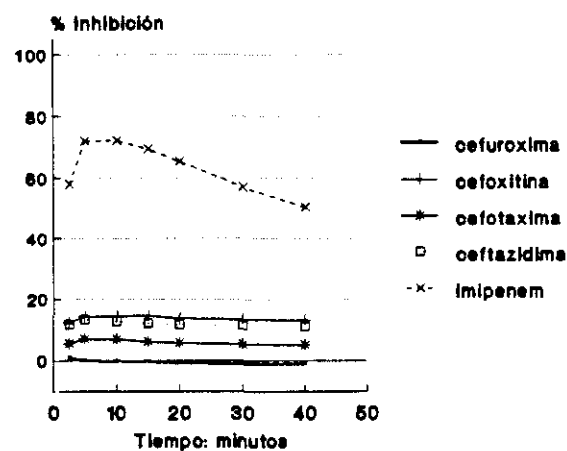
## TEM-1 (pl 5,4)



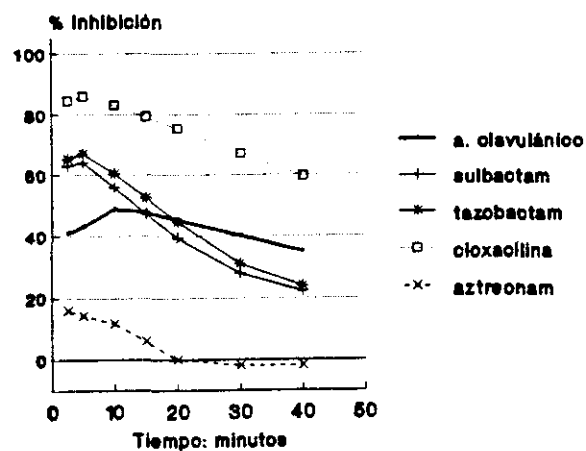
## IRT-3 (pl 5,4)



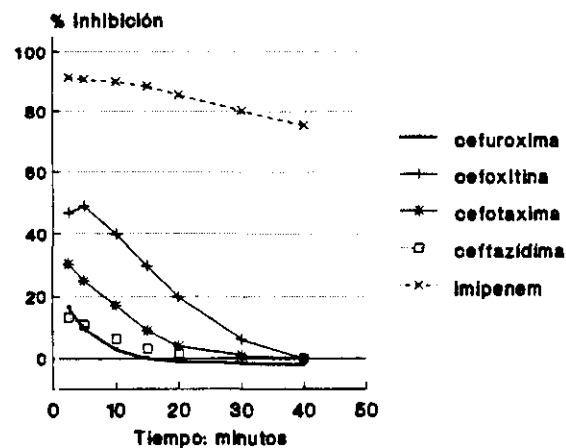
## IRT-3 (pl 5,4)



## 15521/90 (pl 5,4)

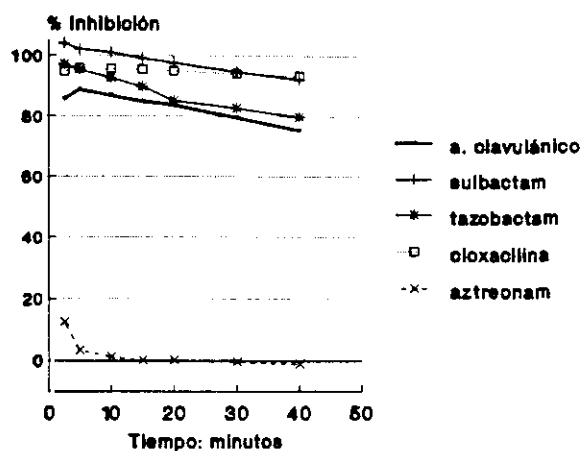


## 15521/90 (pl 5,4)

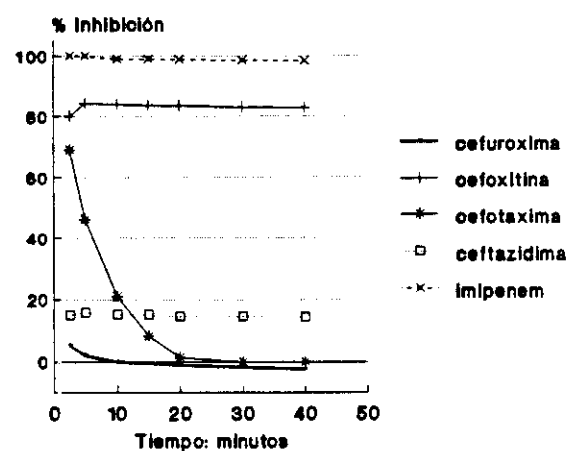


**FIGURA 25.-** Grupo 3, BIPEA de pl 5,4: Inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín en comparación con las  $\beta$ -lactamasas prototipos TEM-7 y TEM-Ha1.

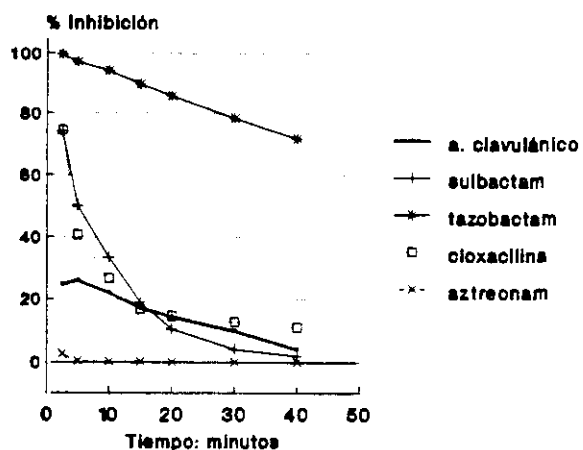
**TEM-7 (pl 5,4)**



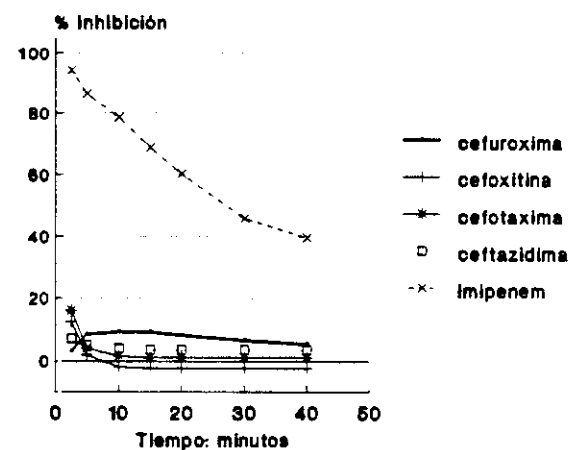
**TEM-7 (pl 5,4)**



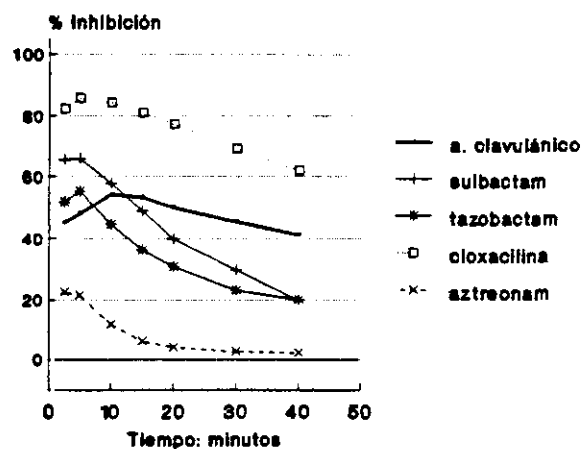
**TEM-Ha1 (pl 5,4)**



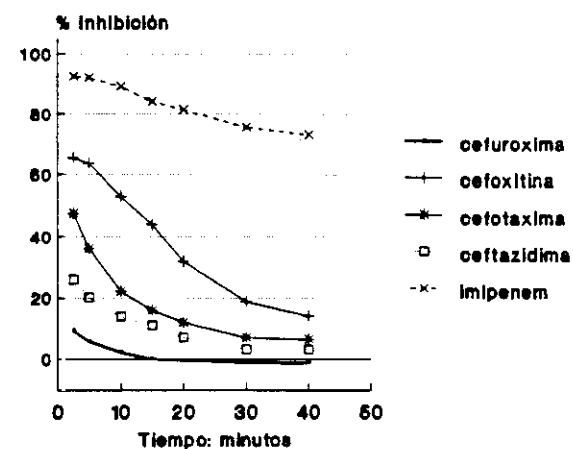
**TEM-Ha1 (pl 5,4)**



**47676/90 (pl 5,4)**



**47676/90 (pl 5,4)**





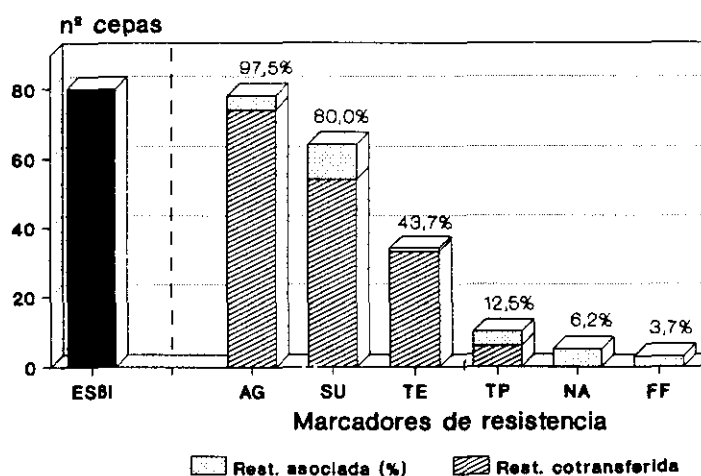
### 5.- RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS NO $\beta$ -LACTAMICOS EN *Enterobacteriaceae* CON $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

La presencia de otros marcadores de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos en las cepas con BIPEA se recoge en la TABLA 46. Los aminoglicósidos (97,5%) y las sulfamidas (80,0%) mostraron la mayor tasa de resistencia asociada, mientras que un número reducido presentaron resistencia asociada a las quinolonas (6,2%) y la fosfomicina (3,7%) (FIGURA 26). Todos los aislamientos, excepto una cepa de *E. gergoviae*, mostraron al menos otro marcador de resistencia asociado: el 7,5% presentaron un solo marcador; el 51,2% dos; el 31,2% tres; y el 8,7%, cuatro o más. Considerando los 80 aislamientos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA, excepto la cepa de *K. pneumoniae* 5162/89 con fenotipo SHV-6 en la que no fue posible obtener transconjugantes o transformantes, en el 94,9% de los casos (74/79) pudo transferirse al menos un marcador de resistencia con la BIPEA.

TABLA 46.- Marcadores de resistencia no  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

Perfil BLPEA	Aislamientos (nº)	MARCADORES DE RESISTENCIA														
		St	Sp	Nm	Km	Ak	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	Su	Tp	Ff	Na
SHV-2	<i>E. gergoviae</i> (1)	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	<i>E. coli</i> (3)	St	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Su	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (1)	St Sp	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Su	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (1)	St	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	..	..	..
	<i>E. coli</i> (1)	St	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (3)	St Sp	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (1)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (1)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Su	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (1)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Ff	..
	<i>E. coli</i> (1)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	..	..	..	..
	<i>E. coli</i> (3)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	..	Su	Tp	..
	<i>K. pneumoniae</i> (4)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	..	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (6)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	..	..	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (1)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	..	Su	..	..
	<i>K. pneumoniae</i> (2)	..	..	..	Km	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	..	..	..	..
<i>K. pneumoniae</i> (1)	..	..	..	Km	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	..	..	..	Na	
<i>K. pneumoniae</i> (4)	St Sp Nm Km Ak	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	Su	..	..	..	..	..	..	..	
SHV-6	<i>K. pneumoniae</i> (1)	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	..	..	Ff	..
	<i>E. coli</i> (1)	St Sp	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Su	..	Ff	..
	<i>E. coli</i> (1)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	..	..	..
TEM-6/8	<i>S. arizonae</i> (25)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	Su	..	..	..
	<i>E. cloacae</i> (1)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	Su	..	..	..
	<i>E. coli</i> (1)	..	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	Su	..	..	..
	<i>E. coli</i> (1)	St Sp Nm Km	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	..	Su	..	..	..	..	..	..
TEM-4	<i>E. coli</i> (7)	..	..	Nm	Km	Ak	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	Su	..	..	..
	<i>S. marcescens</i> (1)	St	..	..	..	..	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Te	Su	Tp	..	Na
TEM-deriv. pI 5,4	<i>E. coli</i> (1)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	Tp	..	..
	<i>E. coli</i> (2)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	Tp	..	..
	<i>E. coli</i> (3)	St Sp Nm Km	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Te	Su	Tp	..	Na

St: estreptomycin; Sp: espectinomycin; Nm: neomicina; Km: kanamicina; Ak: amikacina; Tb: tobramicina; Gm: gentamicina; Ss: sisomicina; Nt: netilmicina; Dk: dibecacina; Te: tetraciclina; Su: sulfametoxazol; Tp: trimetoprim; Ff: fosfomicina; Na: a. nalidixico. **Negrita y cursiva:** marcadores de resistencia cotransferidos con la BIPEA.

**FIGURA 26.- Resistencia asociada y cotransferencia en *Enterobacteriaceae* con BIPEA.**

### 5.1. Enzimas modificantes de aminoglicósidos y co-transferencia de la resistencia.

Todas las cepas con BIPEA excepto dos mostraron resistencia a aminoglicósidos (97,5%), resumiéndose en la TABLA 47 las enzimas modificantes involucradas y los fenotipos a que dan lugar. El 66,6% de las cepas presentaron una única enzima modificante de aminoglicósidos, el 24,3% dos enzimas y el 9% tres. Globalmente, el 74,3% de las cepas fueron resistentes a la gentamicina y la tobramicina y sólo el 14,1% a la amicacina. La incidencia de resistencia del resto de los aminoglicósidos fue la siguiente: dibecacina, netilmicina y sisomicina, 74,3%; estreptomycin, 33,3%; kanamicina, 32,0%; neomicina, 28,2% y espectinomycin, 25,6%.

Las enzimas modificantes de aminoglicósidos, caracterizadas por la técnica de Ozanne y cols. (430), así como sus respectivos perfiles de sustrato se recogen en las TABLAS 47 y 48. La enzima AAC(3)V descrita por Gómez-Lus (189) - AAC(3)V<sup>GL</sup> - fue la más prevalente, detectándose en 46 cepas (58,9%): 15 cepas de *K. pneumoniae* y 3 de *E. coli* en asociación con BIPEA de tipo SHV y 25 cepas de *S. arizonae*, 2 de *E. coli* y 1 de *E. cloacae* con enzimas de tipo TEM. La enzima AAC(3)V<sup>GL</sup> confirió resistencia a gentamicina y tobramicina, obteniéndose unos rangos de CMI que oscilaron entre 32 y 512 µg/ml y 8 y 64 µg/ml, respectivamente. Asimismo, la enzima AAC(3)V descrita por Coombe y George (113) - AAC(3)V<sup>CG</sup> -, identificada en un 14,1% de los aislamientos, 4 cepas de *K. pneumoniae* con SHV-2 y TEM-1 y 7 de *E. coli* con TEM-4, confiere resistencia a la gentamicina y tobramicina pero a diferencia de la anterior añade resistencia o menor sensibilidad a la amicacina (2-16 µg/ml) y mayor nivel de resistencia a la kanamicina (> 1024 µg/ml).

TABLA 47.- Enzimas modificantes de aminoglicósidos en *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

Perfil BIPEA pI Aislamientos (nº)	Perfil de resistencia*	Enzima modificante de aminoglicósidos		
		AAC	ANT	APH
<b>Perfil SHV-2</b>				
7,6 <i>E. coli</i> (3)	St	---	---	APH(3")
<i>K. pneumoniae</i> (1)	Gm Tb Nt Ss Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	---
7,6+5,4 <i>E. coli</i> (1)	St	---	---	APH(3")
<i>K. pneumoniae</i> (1)	St	---	---	APH(3")
<i>E. coli</i> (4)	Gm Tb Ss Nt <sup>I</sup> Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	---
<i>K. pneumoniae</i> (3)	St Sp	---	ANT(3")(9)	APH(3")
<i>K. pneumoniae</i> (3)	Km St Sp Nm <sup>I</sup>	---	ANT(3")(9)	APH(3')I
<i>K. pneumoniae</i> (13)	Gm Tb Nt Ss Km <sup>I</sup> (S) Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	---
<i>K. pneumoniae</i> (4)	Km Gm Tb Nt Ss Dk St Sp Nm <sup>I</sup> Ak <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>CG</sup>	ANT(3")(9)	---
7,6+8,2 <i>K. pneumoniae</i> (1)	St Sp	---	ANT(3")(9)	---
7,6+8,8 <i>E. gergoviae</i> (1) +5,4	---	---	---	---
<b>Perfil SHV-6</b>				
7,6 <i>E. coli</i> (1)	St Sp	---	ANT(3")(9)	APH(3")
<i>K. pneumoniae</i> (1)	---	---	---	---
7,6+7,1 <i>E. coli</i> (1)	Km St Sp Nm <sup>I</sup>	---	ANT(3")(9)	APH(3')I
<b>Perfil TEM-6/8</b>				
5,9 <i>S. arizonae</i> (25)	Gm Tb Ss Nt <sup>I</sup> Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	---
<i>E. coli</i> (1)	Gm Tb Ss Nt <sup>I</sup> Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	---
5,9+5,4 <i>E. coli</i> (1)	Gm Tb Ss St Sp Km <sup>I</sup> Nm <sup>I</sup> Nt <sup>I</sup> Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	APH(3')I APH(3")
5,9+8,8 <i>E. cloacae</i> (1)	Gm Tb Ss Nt <sup>I</sup> Dk <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>GL</sup>	---	---
<b>Perfil TEM-4</b>				
5,9 <i>E. coli</i> (1)	Km Gm Tb Nt Ss Dk Nm <sup>I</sup> Ak <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>CG</sup>	---	---
5,9+5,4 <i>E. coli</i> (6)	Km Gm Tb Ss Dk Nt <sup>I</sup> Nm <sup>I</sup> Ak <sup>I</sup>	AAC(3)V <sup>CG</sup>	ANT(2")	---
5,9+8,0 <i>S. marcescens</i> (1)	Gm Tb Ss St Nt <sup>I</sup> Dk <sup>I</sup>	AAC(3)III	---	APH(3")
<b>Perfil TEM-derivada</b>				
5,4 <i>E. coli</i> (6)	Km Nm St Sp	---	ANT(3")(9)	APH(3')I APH(3")

\*: por dilución en agar, microdilución y difusión por disco; St: estreptomina; Sp: espectinomina; Nm: neomicina; Nt: netilmicina; Km: kanamicina; Ak: amikacina; Tb: tobramicina; Gm: gentamicina; Ss: sisomicina; Dk: dibecacina; <sup>I</sup>: intermedio; (S): sensible; AAC(3)V<sup>GL</sup>: descrita por Gómez-Lus y cols.(1980); AAC(3)V<sup>CG</sup>: descrita por Coombe y George (1982). Subrayado: enzima modificante que cotransfiere con la BIPEA.

**TABLA 48.-** Perfil de sustrato de las enzimas modificantes de aminoglicósidos detectadas en las cepas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

Enzimas modificantes de aminoglucósidos	Perfil de sustrato										
	St	Sp	Nm	Km	Ak	Tb	Gm	Ss	Nt	Dk	Otros
a) <u>Acetiltransferasas</u>											
AAC(3)III			+/-	+	-	+	+	+	+/-	+	5-epi-Ss
AAC(3)V <sup>GL</sup>			-	+/-	-	+	+	+	+	+	
AAC(3)V <sup>CG</sup>			+	+	+/-	+	+	+	+	+	
b) <u>Nucleotidiltransferasas</u>											
ANT(3'')(9)	+	+									
ANT(2'')				+	-	+	+	+	+/-	+	
c) <u>Fosfotransferasas</u>											
APH(3'')	+	-									
APH(3')I			+	+	-						

St: estreptomycin; Sp: espectinomycin; Nm: neomicin; Km: kanamicin; Ak: amikacin; Tb: tobramicin; Gm: gentamicin; Ss: sisomicin; Nt: netilmicin; Dk: dibecacin; 5-epi-Ss: 5-epi-sisomicin; AAC(3)V<sup>GL</sup>: descrita por Gómez-Lus y cols. (1980), similar a AAC(3)II pero con menor actividad frente a Km; AAC(3)V<sup>D</sup>: descrita Coombe y George (1982).

La resistencia simultánea a la estreptomycin y espectinomycin (24,3%) fue debida a la nucleotidiltransferasa ANT(3'')(9), detectándose en 12 cepas de *K. pneumoniae* y 1 de *E. coli* del grupo SHV y 6 de *E. coli* con enzimas de tipo TEM. Asimismo, la resistencia a estreptomycin en ausencia de resistencia a espectinomycin (21,8%) fue debida a la fosfotransferasa APH(3''). Otras enzimas identificadas fueron: APH(3')I, 21,8%; ANT(2''), 14,1%; y AAC(3)III, 1,3%.

Por otra parte, es de resaltar que en todos los casos excepto en 4 aislamientos (94,8%), que presentaron simultáneamente ANT(3'')(9) y APH(3')I, se consiguió transferir al menos uno de los enzimas modificantes de aminoglicósidos (TABLA 47). La enzima más prevalente, AAC(3)V<sup>GL</sup>, transfirió junto con la BIPEA asociada en todas las ocasiones.

### 5.2. Resistencia a quinolonas por mutaciones en *gyrA*.

En nuestra experiencia fue infrecuente la resistencia asociada a quinolonas ya que sólo 5 (6,2%) de las 80 cepas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA mostraron resistencia al ácido nalidíxico y las fluorquinolonas (FIGURA 26 y TABLA 46). La implicación de mutaciones *gyrA*, evidenciada por la disminución de las CMI de las quinolonas al introducir el plásmido pBGB101 con el gen salvaje de la *gyrA* (67), sólo fue posible en una cepa de *K. pneumoniae* con SHV-2 y una de *S. marcescens* con TEM-4. En el resto de los aislamientos, 3 cepas de *E. coli* con un BIPEA de pI 5,4, no se objetivó la disminución de las CMI y por tanto la presencia de mutaciones en *gyrA* (TABLA 49).

**TABLA 49.-** Perfil de sensibilidad a quinolonas en *Enterobacteriaceae* con BIPEA resistentes al a. nalidíxico y sus transformantes con el plásmido pBGB101 con el gen salvaje *gyrA*.

BIPEA	Aislamiento	CMI (µg/ml)					
		NAL	NOR	CIP	TEM	OFL	SPA
SHV-2	<i>K. pneumoniae</i> 61384/92	2,048	1	0,1	0,5	1	0,2
	Tf-61384/92	8	0,2	0,03	0,06	0,1	≤0,01
TEM-4	<i>S. marcescens</i> 51140/89	2,048	4	1	8	4	2
	Tf-51140/89	512	1	0,2	1	0,5	0,2
TFM-pI 5,4	<i>E. coli</i> 47676/90	>4,096	32	2	16	8	4
	Tf-47676/90	>4,096	32	2	16	8	4
	<i>E. coli</i> 45232/90	>4,096	64	4	8	8	4
	Tf-45232/90	>4,096	32	4	8	8	2
	<i>E. coli</i> 44545/90	>4,096	32	2	8	8	4
	Tf-44545/90	>4,096	32	4	4	8	4

NAL: ácido nalidíxico; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina;

TEM: temafloxacina; OFL: ofloxacina; SPA: esparfloxacina.

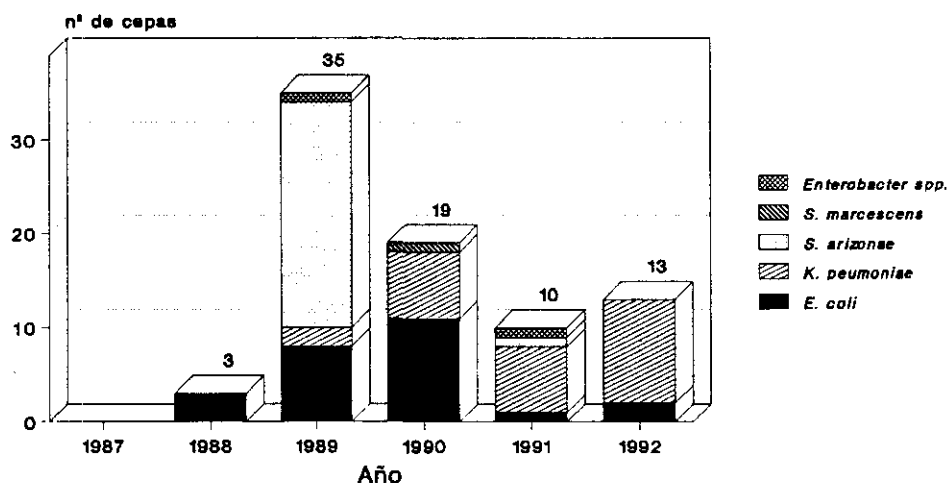
### 5.3. Resistencia a tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y fosfomicina.

La resistencia a las sulfamidas (sulfametoxazol) y el trimetoprim se encontró en 60 (80,0%) y 10 (12,5%) cepas, respectivamente (FIGURA 26 y TABLA 46), pudiendo transferirse en el 82,8% y el 60,0%, respectivamente. La resistencia a la tetraciclina ocupó un lugar intermedio, 43,7%, y sólo un 3,7% lo fue a la fosfomicina. En ninguna de las tres cepas con resistencia a la fosfomicina se consiguió transferir ésta con la BIPEA. Por el contrario, todos los aislamientos con resistencia a tetraciclinas, excepto uno, cotransfirieron ésta con la BIPEA.

## 6.- EPIDEMIOLOGIA DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

Entre los 24.058 aislamientos de *Enterobacteriaceae* estudiados prospectivamente entre marzo de 1987 y diciembre de 1992, identificamos 80 cepas (FIGURA 27) con un patrón de resistencia compatible con la codificación de  $\beta$ PEA, totalizando una incidencia media del 0,33% con valores anuales del 0%, 0,06%, 0,8%, 0,5%, 0,2% y 0,2%, respectivamente. *K. pneumoniae* (27 cepas, 33,8%), *E. coli* (25 cepas, 31,2%) y *S. arizonae* (25 cepas, 31,2%) fueron las especies con mayor incidencia de  $\beta$ PEA. El resto de los aislamientos incluía 2 cepas de *Enterobacter* (2,5%) y 1 de *S. marcescens* (1,3%). Considerando el total de aislamientos de cada género o especie la incidencia de cepas con  $\beta$ PEA fue: *Salmonella*, 2,6%; *K. pneumoniae*, 1,6%; *E. coli*, 0,2%; *S. marcescens*, 0,09% y *Enterobacter*, 0,03%.

FIGURA 27.- *Enterobacteriaceae* con  $\beta$ PEA aisladas en el Hospital Ramón y Cajal (1987-1992).



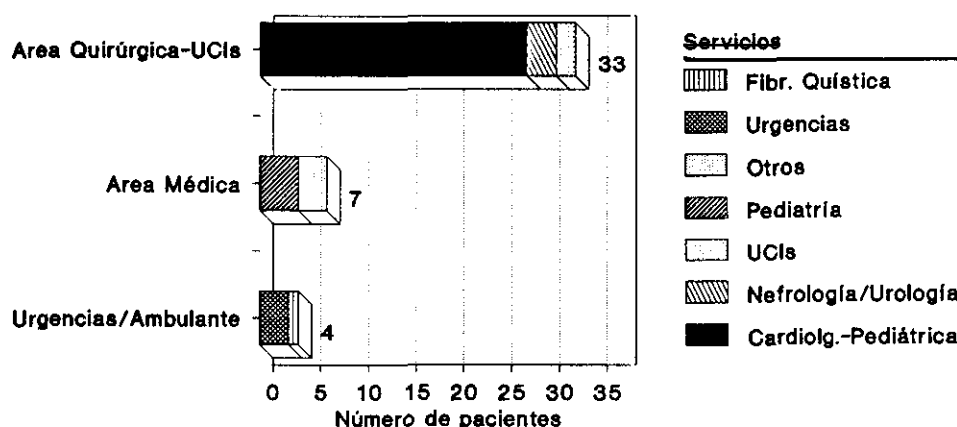
Las 80 cepas con  $\beta$ PEA se obtuvieron a partir de 76 muestras de acuerdo con la siguiente distribución: 24 exudados respiratorios (31,6%), 17 orinas (22,4%), 11 muestras de heces (14,5%), 9 exudados de herida (11,8%), 8 hemocultivos (10,5%) y 7 catéteres (9,2%) (TABLA 50), obteniéndose en cuatro muestras simultáneamente 2 cepas con  $\beta$ PEA. Las 76 muestras procedían de 44 pacientes, 24 hombres y 20 mujeres, con un rango de edad entre 29 días y 78 años. El 68,2% pertenecía a la Unidad de Cardiología Pediátrica, por lo que la media de edad fue relativamente baja, 14,4 años. La distribución por áreas de hospitalización se refleja en la FIGURA 50: el 75,0% procedía de servicios quirúrgicos o unidades de cuidados intensivos y el 15,9% de servicios del área médica, siendo el 9,1% (4 pacientes) enfermos del ámbito extrahospitalario (FIGURA 28).

**TABLA 50.-** Distribución de cepas de *Enterobacteriaceae* con BLPEA en el Hospital Ramón y Cajal (1987-1992) por pacientes, muestras y servicios.

Perfil BLPEA	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. arizonae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>S. marcescens</i>
<b>SHV-2 (pI 7,6)</b>					
nº cepas	8	26	---	1	---
nº pacientes	5 <sup>b</sup>	20	---	1	---
Muestras(nº)	orinas(4) BAS (3 <sup>c</sup> ) catéteres(1)	orinas(4) heridas(3) BAS (11 <sup>c</sup> ) hemocultivos(5) catéteres(3)	---	BAS (1)	---
Servicios( ) <sup>a</sup>	Cardio-Ped.(4 <sup>b</sup> ) Nefrología(1)	Cardio-Ped(15) Urología(1) UCI(2).Pediatria(2)	---	Neumología(1)	---
<b>SHV-6 (pI 7,6)</b>					
nº cepas	2	1	---	---	---
nº pacientes	2	1	---	---	---
Muestras(nº)	heridas(1) orinas(1)	hemocultivos(1)	---	---	---
Servicios( ) <sup>a</sup>	Cardio-Ped(1) Urgencias(1)	Urgencias(1)	---	---	---
<b>TFM-6/8 (pI 5,9)</b>					
nº cepas	2	---	25	1	---
nº pacientes	2 <sup>d</sup>	---	9	1 <sup>d</sup>	---
Muestras(nº)	heces(1) esputos(1 <sup>e</sup> )	---	heces(10) BAS(9),esputos(1 <sup>e</sup> ) heridas(2) catéteres(2 <sup>f</sup> ) hemocultivos(1)	catéteres(1 <sup>f</sup> )	---
Servicios( ) <sup>a</sup>	Cardio-Ped(1) Fibr. Quística(1 <sup>d</sup> )	---	Cardio-Ped(8) Fibr. Quística(1)	Cardio-Ped(1 <sup>d</sup> )	---
<b>TFM-4 (pI 5,9)</b>					
nº cepas	7	---	---	---	1
nº pacientes	2	---	---	---	1
Muestras(nº)	heridas(3) orinas(1) hemocultivos(1) catéteres(1)	---	---	---	orinas(1)
Servicios( ) <sup>a</sup>	Pediatria(1) Urgencias(1 <sup>g</sup> )	---	---	---	Urología(1)
<b>TFM-deriv. (pI 5,4)</b>					
nº cepas	6	---	---	---	---
nº pacientes	3	---	---	---	---
Muestras	orinas(6)	---	---	---	---
Servicios( ) <sup>a</sup>	Gastroenterología(1) Rehabilitación(1) Pediatria-(1)	---	---	---	---

<sup>a</sup>: pacientes por servicio; <sup>b</sup>: un paciente también con una cepa de *K. pneumoniae* con SHV-2; <sup>c</sup>: en un BAS se aisló simultáneamente *E. coli* y *K. pneumoniae*; <sup>d</sup>: un paciente también con *S. arizonae*; <sup>e</sup>: se aisló simultáneamente *E. coli* y *S. arizonae*; <sup>f</sup>: se aisló simultáneamente *E. cloacae* y *S. arizonae*; <sup>g</sup>: ingresado anteriormente en Pediatria; amb: paciente ambulatorio.

**FIGURA 28.-** Distribución de pacientes con aislamientos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA por áreas de hospitalización.



Hasta junio de 1988 no se detectaron en nuestro hospital las primeras cepas productoras de BIPEA en 2 enfermos del área de cuidados intensivos de la Unidad de Cardiología Pediátrica. En 1989 fueron 13 los pacientes en los que se identificaron cepas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA (9 implicados en una misma epidemia en la Unidad de Cardiología Pediátrica); en 1990 en 12 pacientes; en 1991 en 7; y por último en 1992 en 10 enfermos. Considerando globalmente los 44 pacientes, el 61,3% presentó un solo aislamiento mientras que en el 39,7% restantes se obtuvieron más de 1 aislamientos de la misma especie (29,5%) o de distinta especie (9,1%). Se consideraron "aislamientos distintos" aquellos que mostraban características bioquímicas diferentes (por ejemplo, de un paciente se aislaron dos cepas de *E. coli*, una fermentadora y otra no fermentadora de la lactosa), se obtenían en fechas diferentes o bien, aun aislándose en el mismo día, procedían de localizaciones distintas.

En 4 de los 44 pacientes no pudo consultarse la historia clínica, por lo que el análisis de los factores asociados al aislamiento de *Enterobacteriaceae* con BIPEA se realizó en 40. La estancia hospitalaria media fue de  $49,1 \pm 28,9$  días (rango 13-124), cifra superior a la estancia media del total de los pacientes ingresados en nuestro hospital (12,9 días) en el período de estudio. La media de aparición de un aislamiento con BIPEA desde el ingreso fue de  $24,6 \pm 13,8$  días (rango 10-64).

Considerando el tratamiento previo con antimicrobianos como factor de riesgo asociado, todos los pacientes analizados excepto 1 habían recibido antibióticos antes de la detección de la cepa



productora de BIPEA. En dicho paciente se aisló una cepa de *E. gergoviae* que posteriormente se valoró como colonización y no como infección. De los pacientes tratados, 3 recibieron únicamente profilaxis quirúrgica con cefazolina o cefazolina más gentamicina y uno cotrimoxazol en monoterapia. De los restantes, 10 recibieron dos antibióticos, otros 10 tres antibióticos, 9 cuatro y 6 más de cuatro antibióticos. La duración media del tratamiento antibiótico previo fue de  $9,9 \pm 4,7$  días (rango 3-32).

Los  $\beta$ -lactámicos fueron los **antibióticos más frecuentemente administrados**, a 12 pacientes en monoterapia y a 22 en combinación con aminoglicósidos. De todos ellos, la cefotaxima se pautó en 17 pacientes y la ceftazidima y la cefazolina en 12, respectivamente. La combinación de una cefalosporina de 3ª generación y un aminoglicósido fue empleada en 14 pacientes, no destacando ninguna asociación en concreto: ceftazidima más gentamicina ó tobramicina, 7 pacientes; cefotaxima más gentamicina ó tobramicina, 6 pacientes; y cefotaxima más ampicilina, 1 paciente. Las penicilinas naturales o semisintéticas se emplearon en 17 enfermos, en 4 de ellos en asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasa (amoxicilina/clavulánico), mientras que la ceftriaxona, aztreonam e imipenem en un enfermo cada uno. Entre los aminoglicósidos el más empleado fue la gentamicina (14 pacientes), seguido de tobramicina (9) y ampicilina (2). El número de pacientes tratados con otros antibióticos fue el siguiente: vancomicina, 10; eritromicina, 2; clindamicina, 2; y cotrimoxazol, 2.

Por otra parte, pudimos constatar que el 82,5% de los pacientes reunían criterios de infección y el 10% de colonización, no pudiendo determinarse en el resto si el aislamiento correspondió a infección o colonización. Ninguno de los pacientes colonizados recibió tratamiento antibiótico específico. Por el contrario, 19 de los pacientes infectados (57,5%) fueron tratados con imipenem, 7 (21,2%) con imipenem más un aminoglicósido (gentamicina o ampicilina), 2 con fluorquinolonas, 1 con cefoxitina más ampicilina y en 4 se instauró un tratamiento inicial con cefalosporinas de 3ª generación (3 en asociación con gentamicina), substituyéndose con posterioridad por imipenem. De los pacientes tratados 5 fallecieron, no pudiendo atribuirse este hecho únicamente a la infección, puesto que cuatro eran enfermos con graves malformaciones cardio-respiratorias y el otro un enfermo terminal con cirrosis hepática.

#### 6.1.- Grupo 1.- BIPEA de pI 7,6: SHV-2 y SHV-6.

El número de aislamientos con una banda de pI 7,6 incluía 27 cepas de *K. pneumoniae*, 10 de *E. coli* y 1 de *E. gergoviae* procedentes de 28 pacientes de los cuales el 82,1% estaban ingresados en servicios quirúrgicos o en unidades de cuidados intensivos (TABLA 50).

Los primeros aislamientos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA de nuestro hospital (junio de 1988) constituyeron el primer hallazgo de estas enzimas en España (28). En este pequeño brote que afectó sólo a 2 pacientes de la Unidad de Cardiología Pediátrica se identificaron 3 cepas de *E. coli* con un perfil típico de SHV-2. En años posteriores, en 16 pacientes de la misma Unidad, 4 en 1990, 4 en 1991 y 8 en 1992, se aislaron 20 cepas de *K. pneumoniae* y 2 de *E. coli* con la misma enzima de pI 7,6 (SHV-2). Asimismo, en 2 pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (septiembre, 1989 y junio, 1991), 1 del Servicio de Urología (octubre, 1990) y 2 del Servicio de Pediatría (febrero y noviembre, 1992) se aislaron 6 cepas de *K. pneumoniae* con SHV-2, mostrando una de ellas una banda secundaria de pI 8,2 que no transfirió por conjugación. Además, en 1 paciente del Servicio de Nefrología (julio, 1990) se identificaron 3 cepas de *E. coli* con SHV-2 y en 1 paciente del Servicio de Neumología se aisló una cepa de *E. gergoviae* (noviembre, 1991) con esta misma enzima. Con respecto al tratamiento, es interesante reseñar que 18 de los 25 pacientes con aislamientos con la enzima SHV-2 recibieron previamente cefalosporinas de 3ª generación: 9 cefotaxima, 4 ceftazidima, 1 ceftriaxona y 4 ceftazidima y cefotaxima.

El segundo perfil de sensibilidad asociado con una  $\beta$ -lactamasa de pI de 7,6, SHV-6, se encontró en 2 cepas de *E. coli* y 1 de *K. pneumoniae*. Una de las cepas de *E. coli* (abril, 1989) y la de *K. pneumoniae* (enero, 1989) se aislaron en los hemocultivos de 2 pacientes tomados en el momento del ingreso y presentaron una única enzima de pI 7,6 que pudo transferirse por conjugación sólo en el caso de *E. coli*. La otra cepa de *E. coli* (noviembre, 1990), se obtuvo de la orina de 1 enfermo de la Unidad de Cardiología Pediátrica, mostrando una banda de pI 7,6 y otra de pI 7,1 identificada como OXA-3.

#### 6.2.- Grupo 2.- BIPEA de pI 5,9: TEM-6/8 y TEM-4.

El número de aislamientos con una banda de pI 5,9 incluía 9 cepas de *E. coli*, 25 de *S. arizonae*, 1 de *E. cloacae* y 1 de *S. marcescens*. Estas procedían de 13 pacientes, de los cuales el 76,9% estaban ingresados en servicios quirúrgicos o en unidades de cuidados intensivos (TABLA 50). Se identificaron dos tipos de enzimas, TEM-6/8 y TEM-4, estando la primera esencialmente relacionada con la Unidad de Cardiología Pediátrica, y la segunda con el Servicio de Pediatría.

El grupo de *Enterobacteriaceae* con perfil TEM-6/8 fue el más numeroso debido, fundamentalmente, a que su aparición estuvo unida a la única epidemia por BIPEA acaecida en nuestro Hospital que afectó a la Unidad de Cardiología Pediátrica. Este episodio estuvo precedido del aislamiento en 2 pacientes de esta Unidad, entre enero y mayo de 1989, de una cepa de *S. arizonae* sensible a la ampicilina. Con posterioridad, en junio del mismo año, se aislaron en 8

pacientes 24 cepas de *S. arizonae* a partir de 9 muestras respiratorias, 10 de heces, 2 heridas, 2 catéteres y 1 hemocultivo, resistentes a ceftazidima (512-1024  $\mu\text{g/ml}$ ) y menos sensible a cefotaxima (2-4  $\mu\text{g/ml}$ ). Todas las cepas de *S. arizonae* presentaban el mismo fenotipo de resistencia (TABLA 40), perfil bioquímico (código de API: 7704552) y serológico [ $C_1$  (6,7) g,m,s]. Además, elegido un aislamiento de cada paciente y digerido el ADN total obtenido por la técnica de Pitcher y cols. (459) modificada por Alonso y cols. (4) se obtuvo un perfil de restricción con *EcoRI* idéntico en todas las cepas (FIGURA 29). De los transconjugantes se obtuvo un plásmido de tamaño aproximado de 59 Kb que codificaba la  $\beta$ lactamasa de pI 5,9, TEM-6/8 (FIGURA 23). En un paciente de esta misma Unidad se aisló, en los controles epidemiológicos de las heces, una cepa de *E. coli* con 2 plásmidos de 63 y 2 Kb. El primero de ellos codificaba dos enzimas, una de pI 5,4 (TEM-1) y otra de pI 5,9 (TEM-6/8). En otro paciente se aisló de un catéter una cepa de *S. arizonae* y otra de *E. cloacae*, esta última con 2  $\beta$ -lactamasas, una de pI 5,9 y otra de pI 8,8 (cromosómica). El perfil de resistencia del transconjugante, únicamente con la  $\beta$ -lactamasa de pI 5,9, fue similar al de la *S. arizonae*.

**FIGURA 29.-** Perfil de restricción con *EcoRI* del ADN total de 8 cepas de *S. arizonae* aisladas en la epidemia de la Unidad de Cardiología Pediátrica.



Líneas: 1 y 11,  $\lambda$ /HindIII; 2, *S. arizonae* ATCC 12323; 3, *S. arizonae* 36536/89; 4, *S. arizonae* 35918/89; 5, *S. arizonae* 39737/89; 6, *S. arizonae* 38860/89; 7, *S. arizonae* 39118/89; 8, *S. arizonae* 11H/89; 9, *S. arizonae* 2H/89; 10, *S. arizonae* 17H/89.

De los 9 pacientes implicados en esta epidemia, solamente 4 habían recibido cefalosporinas de 3ª generación (2 ceftazidima, 1 cefotaxima y 1 ambas cefalosporinas), mientras que al resto se les administró penicilinas o cefazolina. Asimismo, en esta Unidad se detectó un importante aumento del consumo de ceftazidima en los 6 meses que precedieron a la aparición de la epidemia (192 gramos) con respecto al consumo del mismo período del año anterior (110 gramos).

Es de destacar que, sin ningún nexo epidemiológico evidente, se aisló en enero de 1991 a partir del esputo de un paciente ambulante seguido por la Unidad de Fibrosis Quística, una cepa de *S. arizonae* y otra de *E. coli* que presentaron positividad en la prueba de doble difusión con disco y un patrón de resistencia similar al observado en las cepas de la epidemia antes citada (TABLA 40). Como único factor predisponente, este paciente recibió nebulizaciones de aztreonam (1 g/12 h) con anterioridad al aislamiento de la cepa resistente.

El perfil de sensibilidad TEM-4 se identificó inicialmente en 6 cepas de *E. coli* (abril de 1989) obtenidas de hemocultivos, herida y catéter de un enfermo de la UVI de Pediatría que previamente había recibido ceftazidima y cefotaxima. Con posterioridad, en la orina de un enfermo que 2 meses antes había estado ingresado en Pediatría (enero 1990) se aisló 1 cepa de *E. coli* con una BIPEA de pl 5,9 que confería un perfil de resistencia similar al observado en las cepas anteriores. Por último, en un paciente del Servicio de Urología (septiembre, 1990) se aisló 1 cepa de *S. marcescens* con dos bandas en el isoelectroenfoque: una de pl 8,0 y otra de 5,9, mostrando el transconjugante una sola de pl 5,9 y un perfil de resistencia similar al de las cepas aisladas en Pediatría. Este paciente había recibido únicamente cotrimoxazol.

### 6.3.- Grupo 3.- BIPEA de pl 5,4.

Este tercer grupo se identificó en 6 cepas de *E. coli* aisladas durante 1990 en la orina de 3 pacientes no relacionados entre sí (Pediatría, febrero de 1990; Rehabilitación, agosto de 1990; Gastroenterología, agosto 1990). Dos pacientes habían recibido previamente penicilinas semisintéticas, uno en asociación con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (amoxicilina/clavulánico), mientras que al otro, ingresado en Gastroenterología, se le administró cefotaxima.

### 6.4. Portadores fecales de *Enterobacteriaceae* productoras de BIPEA.

Se estudiaron 1.239 muestras de heces de 849 pacientes (64,1% seguidos en régimen ambulatorio), aislándose 7 cepas con un perfil de resistencia compatible con la codificación de BIPEA: 5 cepas de *E. coli*, 1 de *K. pneumoniae* y 1 de *C. freundii* (TABLA 51). Estas cepas procedían de 5 pacientes,

uno ingresado y el resto atendidos por las consultas externas de nuestro hospital, constatándose que estos últimos habían estado ingresados con anterioridad. En los cultivos procedentes de los pacientes de los Ambulatorios que participaron en este estudio no se obtuvieron cepas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

**TABLA 51.- *Enterobacteriaceae* con BIPEA de portadores fecales: perfil de sensibilidad ( $\mu\text{g/ml}$ ).**

Antibiótico	pI 8,0		pI 7,6+8,2	pI 5,9	pI 5,9+5,4
	<i>E. coli</i> (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	<i>C. freundii</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> (3)
Ampicilina	>1024	>1024	>1024	512	>1024
Piperacilina	256	256	256	128	512-128
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024	1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	>1024	1024	>1024
Amox./clav.	16/8	8/4	16/8(8/2) <sup>b</sup>	4/2	16/8-4/2
Ticar./clav.	32/2	32/2	8/2	8/2	32/2-16/2
Piper./tazo.	16/2	32/4	8/1	16/2	32/4
Cefazolina	256	512	256	32	64-32
Cefuroxima	64	64	64	8	32-8
Cefotaxima	64	32	32(16)	32	64-32
Ceftizoxima	4	2	32	16	32-16
Ceftriaxona	16	32	32	32	32-16
Cefpiroma	2	4	4	8	16-8
Ceftazidima	2	4	8(8)	4	16-4
Aztreonam	4	8	8(8)	4	16-4
Cefoxitina	1	2	>32(4)	4	8-2
Moxalactam	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5-0,2
Imipenem	0,1	0,1	0,5	0,1	0,2-0,1
Meropenem	0,03	0,03	0,03	≤0,01	0,03
Gentamicina	0,5	0,5	1	0,2	>128(0,5-1)
Tobramicina	1	1	1	0,5	64(0,5-1)
Amicacina	2	2	2	1	4(2-4)
Tetraciclina	S <sup>a</sup>	S	S	S	R(R) <sup>b</sup>
Sulfametoxazol	S	S	S	R(S)	R(R)
Trimetoprim	S	S	S	R(S)	R(R)
Fosfomicina	<16	<16	<16	<16	<16
A. nalidixico	2	1	1	1	>128(2-4) <sup>c</sup>
Ciprofloxacina	0,03	0,03	0,06	≤0,01	8-16(0,03-0,2) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: sensibilidad por difusión con disco; <sup>b</sup>: sensibilidad del transconjugante;

<sup>c</sup>: sensibilidad del transformante con el plásmido pBGB101.

La cepa de *C. freundii* mostró en el isoelectroenfoque dos bandas, una de pI 7,6 y otra de pI 8,0; la primera se observó en el transconjugante que presentó en el estudio de sensibilidad un perfil SHV-2. Esta cepa procedía de un paciente ambulatorio del Servicio de Pediatría que había permanecido 25 días hospitalizado sin recibir tratamiento antibiótico.

Cuatro de los 5 aislamientos de *E. coli* mostraron una banda de pI 5,9 (TABLA 51). Estas cepas procedían de 3 enfermos, uno ingresado en el Servicio de Neumología que había recibido cotrimoxazol y eritromicina y 2 pacientes ambulatorios del Servicio de Medicina Interna y la Unidad de Enfermedades Infecciosas que habían recibido cefotaxima durante su estancia en el hospital. El perfil de resistencia fue similar en todos los casos y se caracterizó por unos valores de CMI para cefotaxima más elevados que los de ceftazidima, siendo éstos similares a los de aztreonam (TABLA 51).

Por último, en otro paciente ambulatorio de Medicina Interna, tratado con cefotaxima, tobramicina, clindamicina y ciprofloxacina durante su estancia previa en el hospital, se obtuvo una cepa de *E. coli* y otra de *K. pneumoniae*, ambas con una  $\beta$ -lactamasa de pI 8,0. El perfil de resistencia asociado mostró unos valores de CMI para cefotaxima de 16 a 32 veces más elevados que los de ceftriaxona, ceftiofama y ceftazidima (TABLA 51).

El estudio de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos mostró que 3 de las 4 cepas de *E. coli* con una  $\beta$ -lactamasa de pI 5,9 eran resistentes a quinolonas, relacionándose con mutaciones *gyrA*. Además, estos 3 aislamientos fueron resistentes a tetraciclinas, sulfametoxazol y trimetoprim, transfiriéndose estas resistencias junto con la  $\beta$ IEA. Asimismo, se detectó la presencia de enzimas modificantes de aminoglicósidos, APH(3") y AAC(3)V<sup>GL</sup>, cotransfiriendo sólo la primera con la  $\beta$ IEA.

## **V.- DISCUSSION**

---

## 1.- EVOLUCION DE LA SENSIBILIDAD Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS EN *Enterobacteriaceae* (1987 - 1992).

El estudio de la evolución de la sensibilidad a los diferentes grupos de antibióticos, y en particular a los  $\beta$ -lactámicos, no debe circunscribirse a la simple aportación del número de bacterias resistentes y a su variación en el tiempo. La resistencia a un antibiótico dado está determinada por uno o varios mecanismos de resistencia que responden, en términos generales, a uno o varios determinantes genéticos. Por ello, la expresión de un gen que codifica un mecanismo de resistencia ocasiona una resistencia fenotípica de nivel variable que da lugar a un determinado fenotipo de resistencia (83,144,250,293).

La caracterización del **fenotipo de resistencia** en un microorganismo dado para un grupo de antibióticos de una misma familia, permite realizar inferencias acerca del correspondiente mecanismo bioquímico de resistencia a partir del cual se pueden deducir comportamientos fenotípicos a veces no detectados en la primera caracterización. Este análisis ha sido recientemente denominado por Courvalin (116) "**lectura interpretativa**" y facilita, una vez realizado, la adecuada calificación clínica de los resultados obtenidos. Asimismo, al estudiar la sensibilidad a lo largo del tiempo, la lectura interpretativa permite conocer la evolución de los distintos mecanismos de resistencia más que el simple análisis porcentual de las variaciones observadas (112,117,319,524,537).

Por otra parte, la "lectura interpretativa" hace posible la discriminación de fenotipos comunes de otros menos habituales o raros y de los fenotipos "imposibles", de tal forma que la reiteración de perfiles inesperados podría indicar la existencia de un nuevo mecanismo de resistencia (116). El análisis de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacteriaceae* y su evolución en el tiempo nos ha permitido conocer, a la luz de su "lectura interpretativa", los diferentes fenotipos de resistencia, la modificación de estos patrones en el tiempo y la constatación de un fenotipo raro en nuestro hospital: *Enterobacteriaceae* con BIPEA.

### 1.1.- *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Proteus mirabilis*.

Esta triada constituye uno de los grupos de microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología clínica. En ellos, los mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos son similares (83,144,250,293), si bien diferencias en la participación e incidencia justifican su discusión por separado.



- *Escherichia coli*.

*E. coli*, aun siendo ubicuo e integrante de la flora normal del hombre, puede producir gran variedad de infecciones, que incluyen tanto cuadros de menor entidad clínica como otros más importantes: bacteriemia, meningitis neonatal y neumonía nosocomial (153). No es por tanto de extrañar que sea uno de los patógenos más estudiados tanto en el campo de la patogenia como en el de la resistencia a los agentes antimicrobianos. En esta especie, el mecanismo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos más significativo es la producción de  $\beta$ -lactamasas (362) y en un segundo término otros que incluyen modificaciones en la membrana externa (216,256,402,409,410) y alteraciones en las PBP (proteínas fijadoras de penicilinas) (331,404,553,554,597).

La producción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *E. coli*,  $\beta$ -lactamasa de clase Ib, se realiza de forma constitutiva por el gen *ampC* (418,502,507,560). Su expresión en condiciones normales determina una baja cantidad de enzima (261) y condiciona, en ausencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas, un fenotipo sensible a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (351,503). En nuestra experiencia, y teniendo en cuenta todos los aislamientos de *E. coli* desde 1987 a 1992, se correspondería con una población importante que supera el 40% (fenotipo I). El aumento en la cantidad del enzima, bien por mutaciones que afectan al promotor o atenuador del gen *ampC* (58,261) o por un mayor número de copias del propio gen *ampC* (151,417,426), determinaría un fenotipo similar al VI, de baja incidencia (< 1%), constituido por cepas resistentes a la ampicilina y amoxicilina/clavulánico (351) y sensibles a la ticarcilina. Un mayor nivel enzimático podría afectar a la cefoxitina y a la ceftazidima y en menor medida a la cefotaxima (349,565) (fenotipo VII, 0,2%) (TABLA 23).

La incidencia de aislamientos sensibles a la ampicilina, 43,8% (CMI < 16  $\mu$ g/ml), y por tanto con un bajo nivel de producción de  $\beta$ -lactamasa cromosómica y ausencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas, es inferior a la encontrada por otros autores, que oscila entre el 54% y el 92% (22,112,146,258,284,524,537,538,545,546). Por el contrario, el porcentaje de aislamientos que posee un fenotipo compatible con la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ib, fenotipos VI y VII (< 2%), está en concordancia con lo referido en otros estudios (112,258,304,362,494,524,538, 550,614) si bien en algunas series la incidencia se eleva hasta un 20% (351,362).

El resto de los aislamientos de *E. coli* (fenotipos II-V, 55,6%) se caracterizan por ser resistentes simultáneamente a la ampicilina y la ticarcilina, denotando, con una alta probabilidad, la presencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (112,254,362). Hasta el momento se han identificado en *E. coli* 14  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro: TEM-1, -2, SHV-1, OXA-1,-2,-3 (178,356,366, 492,603,607) -4, y -7 (13), PSE-1 y -2, OHIO-1 (366,607), TLE-1 (365), HMS-1 (356) y SAR-2 (393).

La enzima TEM-1 es la más prevalente, destacando posteriormente OXA-1, -2, TEM-2 y SHV-1 (178,254,304,356,362,366,491,492,603,607). Todas ellas confieren un perfil de sensibilidad muy similar, siendo difícil su individualización fenotípica (342). TEM-1 es inhibida eficazmente por el ácido clavulánico (248,314) y no confiere, en estado de producción normal, resistencia a la cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima (251,254). Los aislamientos de *E. coli* con esta enzima estarían incluidos dentro del fenotipo II (31,5%).

La hiperproducción de TEM-1, debida generalmente a plásmidos multicopia (339,395), incrementa los valores de CMI para la amoxicilina/clavulánico, cefazolina e incluso la cefuroxima (fenotipo III) (112,175,338,432,493,505,525,537,608). Si utilizamos la resistencia a la cefazolina como marcador y excluimos otros posibles mecanismos de resistencia que afecten la actividad de este antibiótico, su incidencia sería del 11,8%, cifra superior a la estimada en nuestro hospital por Martínez-Beltrán (340) durante el período 1977-1986 (2,7%). La incidencia en nuestra serie es muy similar a la descrita por Shannon y cols. (12,9%) (524) en un amplio estudio que incluye cepas de *E. coli* aisladas de hemocultivos desde 1969 a 1991. Parcializando los valores de este trabajo en distintos períodos, la hiperproducción de TEM-1 (calculada en función de la resistencia a la amoxicilina/clavulánico en los aislamientos con resistencia simultánea a la ampicilina y la carbenicilina) fue entre 1969 y 1977 del 8,1%, y de un 16,4% entre 1989 y 1991. En un trabajo multicéntrico recientemente realizado en la Comunidad de Madrid (6), la incidencia de aislamientos de *E. coli* procedentes de bacteriurias extrahospitalarias con resistencia a la amoxicilina/clavulánico, 19%, es ligeramente inferior a la detectada en nuestro laboratorio (24,6%).

Por otra parte, se ha constatado que la hiperproducción de TEM-1 y OXA-1 eleva ligeramente los valores de CMI para la cefotaxima sin modificar los de ceftazidima (254,349), situándolos entre 0,2 y 2 µg/ml. La mayoría de las cepas con este perfil estarían por debajo del PCR elegido y quedarían incluidas en los fenotipos II y III. Asimismo, y aunque documentado en *K. pneumoniae* (447), la hiperproducción de SHV-1 puede disminuir la actividad de la ceftazidima, alcanzándose valores de 8 µg/ml, sin afectar la de cefotaxima. Hasta la fecha no ha sido documentado este fenómeno en *E. coli*.

Otros factores que elevan los valores de CMI para la amoxicilina/ clavulánico son los relacionados con modificaciones en las proteínas de la membrana externa. La pérdida de las porinas - OmpF, OmpC o ambas - incrementa los valores de CMI para las asociaciones de penicilinas e inhibidores de β-lactamasas y las cefalosporinas, quedando menos afectadas las penicilinas (218,232, 254,256,476). La combinación de factores relacionados con la permeabilidad y la hiperproducción de TEM-1 determinaría un mayor nivel de resistencia (476) reflejado en el fenotipo V.

Un inóculo de  $10^7$  UFC/depósito también eleva los valores de CMI para las asociaciones de penicilina e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación (excepto cefoxitina) (340,475,505). Asimismo, la propia inestabilidad a medio plazo del ácido clavulánico en los paneles del sistema semiautomático utilizado en el estudio de sensibilidad (paneles PASCO con soluciones congeladas de antibióticos y conservados a  $-20^\circ\text{C}$ ) podría explicar el mayor porcentaje de cepas resistentes a la amoxicilina/clavulánico (24,6%) en relación a la encontrada para la cefazolina (13,6%) (TABLA 9). La hiperproducción de TEM-1 determina una resistencia común (493,505) y sólo, muy recientemente, ha sido comunicado el hallazgo de cepas de *E. coli* resistentes a la amoxicilina/clavulánico y sensibles a la cefazolina (49,584).

Esta última posibilidad, esta determinada por mutaciones en la secuencia de TEM-1 que confieren resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico y a otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasa (enzimas TRI; "TEM resistant to  $\beta$ -lactamase inhibitors"). Estas cepas tienen la particularidad de ser más sensibles a la cefazolina que aquellas con la enzima TEM-1. Su presencia, adelantada por Bush en 1989 (89), fue confirmada en mutantes "in vitro" por Oliphant y Struhl (424), Manavathu y cols. (332,333,334) y Delaire y cols. (141). Los primeros aislamientos en cepas clínicas se observaron en Francia en 1991 por Belaaouaj y cols. (48), caracterizándose dos  $\beta$ -lactamasas distintas, TRI-1 y TRI-2, ambas con un pI 5,2, en las que la arginina de la posición 241 se substituía por cisteína y serina, respectivamente (49,584). Este caso no parece ser una situación aislada ya que han sido comunicadas en este mismo país (79,535) otras cepas de *E. coli* con similar fenotipo de resistencia pero con una mayor variedad de enzimas en cuanto a sus pI, 5,2, 5,3, 5,4 y 5,5. Recientemente, se ha comprobado que la incidencia de este tipo de cepas procedentes de infecciones urinarias es elevada tanto en el medio hospitalario (14,7%) como extrahospitalario (25,1%) (225). Asimismo, en Escocia, Thomson y Amyes (569) han aislado una cepa de *E. coli* con una  $\beta$ -lactamasa de pI 5,25 (TRC-1) no inhibida por el ácido clavulánico y otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (570).

En España, la primera cepa de estas características se obtuvo en 1992 de un paciente con infección urinaria adquirida en la comunidad que había sido tratado durante dos semanas con amoxicilina/ácido clavulánico. La  $\beta$ -lactamasa implicada poseía una doble mutación: metionina de la posición 67 por isoleucina (responsable de la resistencia) y metionina de la posición 180 por treonina, siendo el pI (5,4) igual al de TEM-1 (5,66). Recientemente se han detectado en nuestro hospital algunos aislamientos de *E. coli* con este fenotipo de resistencia que codificaban una  $\beta$ -lactamasa de pI 5,4 (Martínez-Beltrán y Cantón datos no publicados).

Entre los "fenotipos plasmídicos" en *E. coli*, (fenotipos II-V), la resistencia individual o simultánea a la cefotaxima y ceftazidima y sensibilidad a la amoxicilina/clavulánico y cefoxitina

(fenotipo IV) caracterizan la presencia de BIPEA (oxiiminocefalosporinas) (252,341,453). En esta especie se ha descrito un gran número de enzimas tanto de la familia TEM como SHV (252,508). En nuestra experiencia, su incidencia a lo largo de los 6 años de estudio (0,2%) fue inferior a la encontrada en *K. pneumoniae* (1,6%) (TABLAS 23 y 26) y está en concordancia con la referida en otros trabajos (452,453,538). La caracterización y aspectos epidemiológicos de las BIPEA implicadas se discutirán con posterioridad.

Por otra parte, la codificación de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en cepas de *E. coli* con hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa cromosómica no es un hecho frecuente (493,537). Este perfil, caracterizado por un patrón similar al conferido por la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica pero que además añade un alto nivel de resistencia a la ticarcilina (349,493), quedaría incluido dentro del fenotipo V. En éste también se albergarían, como se expresó anteriormente, las cepas que añaden alteraciones en la membrana externa (232,254,476) y aquellas con un mecanismo de resistencia que involucraría la producción de cefamicinasas o  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase I (441). El prototipo de estas enzimas en *E. coli* es la  $\beta$ -lactamasa BIL-1 (445,611) de pI 8,8 que confiere resistencia a metoxi- $\beta$ -lactámicos, asociaciones entre penicilinas e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, oxiiminocefalosporinas y aztreonam (445). Otras cefamicinasas, con pI que oscila entre 6,8 y 8,9 - CMY-1 (40), CMY-2 (45), MIR-1 (435), MOX-1 (236), LAT-1 (577) y FOX-1 (192) -, encontradas en *K. pneumoniae* presentan, al transferirse a *E. coli*, un fenotipo similar superponible al que se produce en mutantes establemente desreprimidos de *E. cloacae* y *C. freundii*.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores referentes a los fenotipos de resistencia y su explicación en términos bioquímicos, podría afirmarse, al analizar los datos de la evolución de la sensibilidad que existe una tendencia hacia una mayor incidencia de la resistencia. En nuestro hospital y con respecto a períodos anteriores, 1977-1986 (340), se elevaría el número de cepas con una mayor nivel de producción de  $\beta$ -lactamasa plasmídica (fenotipo III) y aparecería un fenotipo nuevo, BIPEA (fenotipo IV) que amplía el espectro hidrolítico afectando a las cefalosporinas de 3ª generación. Sin embargo, es importante destacar, que la resistencia media a la ampicilina se situó en *E. coli* durante el sexenio 1987-1992 en un 56,2%, inferior a la detectada durante el período 1977-1986, 59,7% (340), habiendo disminuido de forma significativa ( $p < 0,001$ ) desde el año 1987 (60,2%) hasta 1992 (54,3%). Esta cifra final es, sin embargo, superior a la encontrada en otras series que oscilan entre el 29% y el 44% (474,524,538,581,587,606).

La reducción de la resistencia a la ampicilina en *E. coli* podría sugerir una menor presencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en esta especie. Martínez-Beltrán estimó en un trabajo previo realizado entre 1977 y 1986 (340) que la incidencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas de tipo TEM en *E.*

*coli* en nuestro medio se situaba en torno al 57%. El mismo planteamiento, surgido del análisis fenotípico indicaría que estas no sobrepasan el 50% en el presente trabajo. Paralelamente a esta apreciación, se ha observado un aumento del número de cepas inhibidas por concentraciones críticas bajas (2 µg/ml de ampicilina, cefuroxima y cefoxitina y 1 ó 2 µg/ml de cefazolina) lo que podría indicar un cambio en el perfil de sensibilidad de *E. coli* con respecto a los antibióticos β-lactámicos: disminución del número de cepas con β-lactamasas plasmídicas (resistencia de alto nivel) y aumento de la resistencia de bajo nivel. La disminución del 5,6% de las cepas resistentes a la ampicilina (TABLA 10) solo compensaría en parte, al desplazarse supuestamente hacia concentraciones de sensibilidad, el aumento del 9,6% de las cepas con una CMI de 2 µg/ml, quedando un 4% de cepas que responderían con mayor probabilidad a mecanismos de resistencia de bajo nivel. A este respecto, se ha demostrado que la pérdida de las porinas OmpF y/o OmpC en *E. coli* determina un ligero aumento de los valores de CMI para la ampicilina y cefazolina que es más acusado para la cefoxitina y cefuroxima (99,218,232,254,256,516). En estos dos últimos antibióticos, la elevación del número de cepas inhibidas por 2 µg/ml supone el 14,8% y el 19,6%, respectivamente.

No es fácil encontrar una explicación clara para estos cambios de comportamiento, ya que siempre la introducción y utilización de nuevos antibióticos β-lactámicos conlleva la aparición de nuevos mecanismos de resistencia. Conviene recordar que en 1944, poco tiempo después de introducirse la penicilina en clínica, Kirby (277) relacionó la producción de penicilinasas con la resistencia de *S. aureus* a la penicilina; en 1948 un 50% de las cepas eran resistentes por producción de esta enzima (56) y años más tarde esta cifra era cercana al 80% (462). Una explicación verosímil por demostrar para la pérdida de la resistencia de alto nivel y aumento de la de bajo nivel, sería el efecto que podría haber ejercido la introducción de las fluorquinolonas en la terapéutica. Este grupo de antibióticos de amplia utilización en los últimos años, ejerce su acción sobre la ADN girasa (527,542,610) y el sistema SOS de la célula (26,303,456,591). Bajo la acción de estos compuestos se ha demostrado un efecto "curativo" cuando se exponen células portadoras de plásmidos a concentraciones subinhibitorias de quinolonas (461,600,601), así como, la disminución de la frecuencia de conjugación en su presencia (86,391) y un cierto cambio en la estructura del peptidoglicano de las bacterias gram-negativas (154,588). Por este motivo, la interacción de estos compuestos con la flora habitual del hombre, y en concreto con *E. coli*, podría haber generado una disminución del número de células portadoras de plásmidos de resistencia y un cambio sutil en la conformación de las porinas de la membrana externa o en su entorno, que afectase a la permeación de las quinolonas y de los antibióticos β-lactámicos al interior de la célula (509,229,232,235), disminuyendo por una parte la incidencia de β-lactamasas plasmídicas pero elevando la resistencia de bajo nivel. Con independencia de otras posible hipótesis, este hecho queda constatado debiendo observarse la evolución del mismo en un período de tiempo más amplio.

- *Salmonella* spp..

La primera referencia en la literatura de la síntesis de una  $\beta$ -lactamasa codificada por elementos extracromosómicos en *Enterobacteriaceae* se realizó por Datta y Kontomichalou (139) en un trabajo publicado en 1965 en el que describen la codificación de la enzima TEM-1 por una cepa de *Salmonella paratyphi* (R7268). Este hecho podría ser considerado fortuito debido a la menor incidencia de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella* con respecto a otras especies de *Enterobacteriaceae* (23), si bien en la actualidad se observa un claro incremento de esta (7,136,520). Los fenotipos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos son similares a los encontrados en *E. coli*. No obstante, una menor incidencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (178,356,362,363,366,560), una mayor participación de los mecanismos de resistencia debidos a problemas en el acceso de los  $\beta$ -lactámicos al punto de actuación (50,369,203) y finalmente que hasta el momento no haya sido posible esclarecer la presencia del gen *ampC* (57,514) en este género, establecen algunas diferencias que inciden en los porcentajes de los fenotipos encontrados (TABLA 24).

La resistencia a la ampicilina, a diferencia de lo sucedido en *E. coli*, aumentó un 14,4% desde 1987 a 1992 ( $p < 0,001$ ) con una media del 19,6%. Esta cifra es elevada si se consideran los aislamientos de nuestro hospital obtenidos entre 1977 y 1986 (6,2%) (193,340), pero está en concordancia con la tasa de resistencia encontrada en países del resto de Europa (136,594), Estados Unidos (136,327) y Asia (302), distanciándose claramente del 1,5% encontrado en Nueva Zelanda (223) y el 85,4% comunicado en Irán (161). En nuestro país esta cifra es variable, oscilando entre el 46% encontrado por Alós y cols. (7) en un área geográfica cercana a nuestro hospital y el 5,5% por Rivera y cols. (487) en un hospital comarcal de la provincia de Zaragoza. Estas diferencias se producen en función de la epidemividad de los diferentes serotipos que lleven asociados plásmidos de resistencia a la ampicilina (103,164,320,386,387,469,479,501).

La relativa baja incidencia de resistencia a la ampicilina determina que la mayor parte de los aislamientos pertenezcan al fenotipo I (80,4%), sensible a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El mecanismo más común en las cepas con resistencia a la ampicilina obedecería a la producción de TEM-1 (178) y se correspondería con los fenotipos II y III (15,4%). Asimismo, con este mismo perfil se han caracterizado otras enzimas plasmídicas, TEM-2, SHV-1, OXA-1 y OXA-2 y PSE-1 (356,362,363,366,560), por lo que no debe descartarse en nuestros aislamientos la presencia de otras  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro distintas de TEM-1. Las tasas globales de sensibilidad y resistencia a la amoxicilina/clavulánico, cefazolina y cefuroxima indicarían que cerca del 5% de las cepas son hiperproductoras de TEM-1 (fenotipo III). No obstante, es posible que este porcentaje indique también niveles normales de TEM-1 asociado a un mecanismo que implique la disminución o

pérdida de las porinas, OmpF u OmpC (50,203,369). La mayor implicación de factores de permeabilidad en *Salmonella* determina una menor actividad intrínseca de la ceftazidima con respecto a *E. coli* (TABLA 22).

Las variaciones que se observaron en *E. coli* a concentraciones bajas de antibióticos solo se manifiestan de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) en *Salmonella* para 2  $\mu\text{g/ml}$  de cefoxitina, elevándose el número de cepas en más del 30% desde 1987 a 1992. La resistencia a quinolonas en este género, expresada en términos de resistencia al ácido nalidíxico (CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ), surgió a partir de 1991 con una cifra del 0,6% en 1991 y 3,3% en 1992 (datos no mostrados en las tablas).

Por otra parte, la codificación de  $\beta$ IPEA (oxiimino- $\beta$ -lactamasas) se corresponde con el fenotipo IV. Su descripción en el género *Salmonella* es relativamente frecuente habiéndose caracterizado tanto  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM (16,98,322,451,490) como SHV (51,52,214,291,451). Su presencia es más común en *S. typhimurium* (39,52,322,181,589) pero también se han encontrado en *Salmonella wien* (214,215,451), *Salmonella panama* (98), *Salmonella enterica* serotipo *kedougou* (16,322) y *Salmonella mbandaka* (467). El porcentaje anormalmente elevado de  $\beta$ IPEA (fenotipo IV) en nuestro hospital (2,6%) se debe, fundamentalmente, a una epidemia por *S. arizonae* con una  $\beta$ IPEA de pI 5,9 y que afectó en junio de 1989 a la Unidad de Cardiología Pediátrica (348), determinando un aumento significativo de la resistencia a la ceftazidima y cefotaxima (TABLAS 11 y 24). La caracterización del enzima implicado se detallará posteriormente.

Los dos últimos fenotipos identificados en *Salmonella* (fenotipos VI y VII), de muy baja incidencia (7 cepas), muestran resistencia a la ampicilina y sensibilidad a la ticarcilina. Estos fenotipos se corresponden, fundamentalmente, en *E. coli* con la síntesis elevada de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ib (58,254,351). La presencia de *ampC* en *Salmonella* es un hecho controvertido aunque Bergstrom y cols. (59) utilizando una sonda intragénica *ampC* de *E. coli* K12 detectaron una secuencia homóloga en *S. typhimurium*, si bien con un menor grado de homología que en cepas de *E. coli*. Estos mismos autores (57) empleando por separado una sonda para el operón *frd* (fumarato reductasa) y otra para *ampC*, situados en la misma zona en *E. coli* K12 con secuencias comunes (199), demostraron que *S. typhimurium* LT2 tenía determinantes con una gran homología para el gen *frd* pero no para *ampC*, por lo que la secuencia necesaria para producir el enzima podría no ser completa y por tanto inoperante. Por ello, los fenotipos VI y VII sólo podrían explicarse, en ausencia de *ampC* en *Salmonella*, por alteraciones en la membrana externa, ya que la producción de niveles bajos de  $\beta$ -lactamasa plasmídica no afectaría a las cefalosporinas.

- *Proteus mirabilis*.

En *Enterobacteriaceae*, *P. mirabilis* ocupa un lugar preferente después de *E. coli* en cuanto a número de aislamientos en el laboratorio clínico (276), siendo más frecuente en muestras de origen urinario, aunque también se ha asociado a bacteriemia, infecciones postquirúrgicas y de tejidos blandos (187).

Los fenotipos de resistencia en *P. mirabilis* se ajustan, en general, a los descritos para *E. coli* y al igual que en *Salmonella* es útil su diferenciación en función de la actividad de la ampicilina y la ticarcilina (TABLA 25). Siguiendo este esquema destaca, en primer lugar, una población mayoritaria, 63,1 %, sensible a todos los  $\beta$ -lactámicos (fenotipo I), que carecería de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos o bien presentaría una  $\beta$ -lactamasa cromosómica de baja expresión que no afecta la actividad de los antibióticos estudiados (491,560). Este porcentaje, prácticamente invariable a lo largo del sexenio, es sensiblemente inferior al encontrado por otros autores (258,328,474,537,538,606) y no difiere sustancialmente de los datos obtenidos en nuestro hospital entre 1977 y 1986 (187,340).

Casi un 25 % de las cepas de *P. mirabilis* se caracterizaron por poseer resistencia simultánea a la ampicilina y ticarcilina debida esencialmente a la síntesis de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (fenotipos II, III y IV). El fenotipo II (13,3 %) respondería a la producción de TEM-1, -2 y OXA-1 (178,356,491,492,531), aunque también se han identificado en esta especie otras  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, SHV-1, OXA-2, PSE-1 (271,356,363,366) y otras menos frecuentes, PSE-4 (607), CEP-1 (69), N-3, N-29 (566) y HMS-1 (359). El fenotipo III (11,2 %) se correspondería con el incremento de la síntesis de TEM-1, que condiciona, como en el caso de *E. coli*, la afectación de la cefazolina y de la asociación amoxicilina/ácido clavulánico (254,339,387). La mayor actividad intrínseca de la cefuroxima en *P. mirabilis*, a diferencia de lo sucedido en *Salmonella* (606), determina un mayor número de cepas resistentes a la cefazolina y sensibles a la cefuroxima.

Un pequeño porcentaje de los aislamientos con resistencia a la ampicilina y ticarcilina mostraron resistencia a la cefoxitina y cefalosporinas de 3ª generación (0,7 %, fenotipo V), constatándose en ellas la ausencia de BIPEA. Estas enzimas de pI que oscilan entre 5,4 (157,158) y 7,2 (596) no han sido encontradas hasta fechas recientes en *P. mirabilis* (63,157,158,489,596). Su baja incidencia (157) podría estar en relación con la baja frecuencia de conjugación plasmídica en esta especie (336). Por ello, el fenotipo V, con resistencia a la cefoxitina, debe responder con mayor probabilidad a una afectación de la permeabilidad. A este respecto, se ha demostrado la obtención de mutantes "in vitro" ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$ ) con estas características seleccionados con una concentración de



25 µg/ml de cefoxitina (380). Su estudio demostró la pérdida de la única porina fundamental (40 kDa) de esta especie (379,516).

Un hecho constatado previamente en nuestro laboratorio (187,319) y común, aunque en menor medida, en *P. vulgaris* (188), es la existencia de un número relativamente importante de aislamientos resistentes a la ampicilina y sensibles a la ticarcilina (11,4%, fenotipo VI) que no producen niveles apreciables de β-lactamasa cromosómica y que, por el contrario, sintetizan β-lactamasas plasmídicas de tipo TEM-1 (187). Los valores de CMI de la ticarcilina para estas cepas (moda 16 µg/ml) son superiores a los obtenidos en las cepas sensibles a la ampicilina e inferiores al PCR utilizado en la diferenciación de los fenotipos (TABLA 7). Junto a este fenotipo, encontramos otro (fenotipo VII) con incidencia inferior al 1% que añade resistencia a la cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima y, en menor medida, a la cefotaxima. Este fenotipo es similar al condicionado por la hiperproducción constitutiva de la β-lactamasa cromosómica en *E. coli* (58,254,351), y, verosímilmente, respondería a esta circunstancia.

En relación a la evolución de la sensibilidad, únicamente destaca el incremento de más del 10% con respecto a la cefazolina ( $p < 0,001$ ). La obtención en 1987 de las cifras máximas de resistencia para la cefazolina (19,1%), cefuroxima (4,3%), cefoxitina (1,8%) y ceftazidima (1,2%), sustentaría la hipótesis de una mayor incidencia de cepas con mayor nivel de β-lactamasa cromosómica al inicio del período estudiado y, probablemente, de forma simultánea un nivel más elevado de producción de TEM-1.

### 1.2.- *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

El género *Klebsiella*, y en particular *K. pneumoniae*, está relacionado tanto con infecciones nosocomiales como con aquellas adquiridas en la comunidad (382,575,607,609). A pesar de presentar una resistencia natural a la ampicilina y la ticarcilina con valores de CMI generalmente desplazados por encima de las concentraciones farmacológicamente alcanzables en el compartimento plasmático, la diferenciación de los fenotipos de resistencia en función de la actividad de estos dos antibióticos sigue siendo un planteamiento válido (258,319,345,493,537). Una vez establecidos, asimilar estos fenotipos a un mecanismo bioquímico de resistencia es menos certero que en *E. coli*. *Klebsiella* es el género con mayor número de β-lactamasas plasmídicas y cromosómicas identificadas (252,363,478,503,560), que confieren fenotipos similares caracterizados por valores para la ampicilina y la ticarcilina superiores a sus PCR (342). En este género se ha identificado un grupo amplio de β-lactamasas cromosómicas (β-lactamasas de clase IV o "constitutivas de *Klebsiella*") con pI que oscilan entre 5,1 y 9,2 (134,220,448,478,485,502,560); 11 β-lactamasas plasmídicas de amplio espectro,

TEM-1,2, SHV-1, HMS-1, OXA-1,3, PSE-2,3, OHIO-1, LXA-1 y TLE-2 (178,252,356,363,477,478, 492,508,607,615); y más de 40 BIPEA (18,236,341,401,438,471,504,613).

La ausencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas y la síntesis de bajo nivel de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas determinan, tanto en *K. pneumoniae* como en *K. oxytoca*, un bajo porcentaje de cepas sensibles ( $\leq 2\%$ ) que conforman el fenotipo I (TABLA 26). En contraposición, destaca una población mayoritaria cercana al 98%, que se caracteriza por la resistencia simultánea a la ampicilina y ticarcilina (fenotipos II-V) en la que es posible identificar  $\beta$ -lactamasas plasmídicas,  $\beta$ -lactamasas cromosómicas o ambas (356,420,612,613). En este género, la utilización de los valores de sensibilidad a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico como marcador de la codificación de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas no es posible, ya que las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Klebsiella* también son inhibidas eficazmente por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Este hecho no es circunstancial ya que la enzima LEN-1, prototipo de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Klebsiella*, muestra una alta homología con las plasmídicas de tipo TEM (14) y SHV (34,180,238,372,406,420,529). Por ello, no es de extrañar que presenten un comportamiento similar y sean inhibidas por el ácido clavulánico. Con un nivel normal de producción enzimática, los valores de CMI de la asociación amoxicilina/clavulánico son inferiores al PCR (93,254,342,363,503), por lo que las cepas de *Klebsiella* con estas enzimas quedarían incluidas dentro del fenotipo II. Asimismo, se ha demostrado que el extremo N-terminal de la enzima MEN-1, una nueva BIPEA descrita en *E. coli* (61,60), posee alta homología con el de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *K. oxytoca* (15,32,480) y que la denominada  $\beta$ -lactamasa plasmídica KH descrita en *K. oxytoca* (612,613) está relacionada con la clásica  $\beta$ -lactamasa K1 de *K. oxytoca* (90,93,155,265,337), siendo también inhibidas por el ácido clavulánico.

La diferenciación fenotípica entre las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas y plasmídicas de *Klebsiella* puede realizarse ampliando el rango de las concentraciones de aminopenicilinas y carboxipenicilinas (340): las cepas con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, considerando un nivel de producción normal, confieren un nivel de resistencia menor que el determinado por las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas. El fenotipo subyacente de un nivel elevado de  $\beta$ -lactamasa cromosómica es indistinguible, con los antibióticos utilizados, del conferido por la síntesis de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas, y solo permitiría, como referiremos posteriormente, la identificación presuntiva de cepas con hiperproducción de SHV-1.

Referido exclusivamente a mecanismos enzimáticos, la asociación de amoxicilina/ácido clavulánico sólo se ve afectada en las cepas del género *Klebsiella* por la hiperproducción enzimática con independencia de su codificación plasmídica o cromosómica (448,478), y se correspondería con los fenotipos III y IV. La presencia de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas y su hiperproducción es más

frecuente en *K. oxytoca* que en *K. pneumoniae*, como recientemente ha demostrado Reig y cols. (478). La hiperproducción cromosómica afecta a la asociación amoxicilina/clavulánico, cefazolina, cefuroxima, oxiiiminocefalosporinas (cefotaxima) pero no a las cefamicinas (cefoxitina), la ceftazidima y los carbapenems. Esta circunstancia quedaría implícita dentro del fenotipo III y explicaría la mayor incidencia de este fenotipo en *K. oxytoca* (35,6%) con respecto a *K. pneumoniae* (4,9%) (TABLA 26). En el caso particular de la hiperproducción de la enzima K1 de *K. oxytoca* se incrementan los valores de CMI para el aztreonam (8-128 µg/ml) (93,102,265,503), antibiótico no incluido en el análisis fenotípico en nuestra serie.

Por otra parte, las β-lactamasas plasmídicas son más frecuentes en *K. pneumoniae* que en *K. oxytoca*, siendo SHV-1, TEM-1 y TEM-2 las más prevalentes (178,356,478,492,508,531,607). La hiperproducción de TEM-1 no afecta a las cefalosporinas de 3ª generación y quedarían también incluidas dentro del fenotipo III. Por el contrario, es más factible la individualización de las cepas con hiperproducción de SHV-1 (fenotipo VI) ya que afectan, aunque en menor medida que la hiperproducción de K1, al aztreonam (2 µg/ml) y a diferencia de las anteriores, TEM-1 y "cromosómicas de *Klebsiella*", elevan los valores de CMI de la ceftazidima (8 µg/ml) sin modificar las de la cefotaxima (0,03 µg/ml) (447).

En *K. pneumoniae*, a diferencia de *K. oxytoca*, se constató la presencia de BIPEA (oxiimino β-lactamasas) (1,6%) todas ellas del tipo SHV, cuyo fenotipo (fenotipo V) se caracteriza por la sensibilidad a la amoxicilina/clavulánico y cefoxitina y resistencia a la cefazolina, cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima. Esta diferencia de una especie a otra está en concordancia con lo descrito por otros autores (127,128,167,538). El mayor porcentaje de cepas con BIPEA en *K. pneumoniae* (1,6%), en comparación con las encontradas en *E. coli* (0,2%), podría estar en relación con el mayor número de enzimas descritas en *Klebsiella* y la posibilidad de una mayor frecuencia de conjugación en este género ya que no existen diferencias a nivel de expresión entre ambos y tampoco mayor capacidad de estas enzimas para adquirir mutaciones en uno u otro huésped (270).

Un fenotipo próximo al anterior (fenotipo VI), que añade resistencia a la cefoxitina, se correspondería con el que confieren las cefamicinasas (TABLA 4) o, más probable en nuestro caso, con aislamientos con alteraciones en la membrana externa. La primera hipótesis, no encontrada en nuestro hospital, afectaría a todos los β-lactámicos con la excepción de los carbapenems (342,445). Estas enzimas, por el momento infrecuentes, se han descrito en *K. pneumoniae*: MIR-1 (435), CMY-1,2 (40,45), MOX-1 (236), LAT-1 (577) y FOX-1 (192). Las cefamicinasas MIR-1, CMY-2 y MOX-1 tienen una relación demostrada con *ampC* de *E. cloacae* (179,435), *C. freundii* (43) y *P. aeruginosa* (236,315), respectivamente. La segunda explicación para el fenotipo VI, parcialmente

extensible al fenotipo VII, estaría en relación con factores de permeabilidad. Esta participación se ha puesto de manifiesto durante el tratamiento con cefamandol (579) o cefoxitina (433) de infecciones por *K. pneumoniae*, demostrándose que la ausencia o disminución de una de las dos porinas fundamentales de 39-40 o 41 kD (208,458) determina un aumento en los valores de CMI para la cefoxitina y ceftazidima y en menor medida para la cefotaxima (205,433,458,509,582). Este mismo hecho se ha podido constatar en cepas de *K. pneumoniae* con  $\beta$ lPEA (205,433,582).

Por último, la existencia de cepas resistentes a la ampicilina y sensibles a la ticarcilina (fenotipos VII) es menos frecuente que en *E. coli* y *P. mirabilis* (TABLAS 23, 25 y 26). Este fenotipo estaría relacionado con una producción moderada de  $\beta$ -lactamasa cromosómica que afectaría a la ampicilina pero no sería suficiente para sobrepasar el PCR de la ticarcilina. Alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa determinarían, en este fenotipo, el incremento de CMI para la cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima.

Con respecto a la evolución de la sensibilidad a lo largo del sexenio 1987-1992, la estabilidad de la resistencia a la ampicilina y ticarcilina tanto en *K. pneumoniae* como en *K. oxytoca* es coincidente con lo referido por otros autores (84,171,421,474,538,587,606). Por el contrario, la disminución de la resistencia a cefazolina en *K. oxytoca* (19,1%), y de forma menos acusada en *K. pneumoniae* (4,8%), indicaría una menor presencia de cepas con hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa cromosómica o plasmídica al final del período de estudio (FIGURA 2). En *K. oxytoca*, quedaría refrendado por la disminución paralela de la resistencia a la cefuroxima (3,3%) y la asociación amoxicilina/ácido clavulánico (8,9%), mientras que en *K. pneumoniae* la menor presencia de cepas con estas características (478) redundaría en una mayor estabilidad de estos dos antibióticos. Por otra parte, la disminución de la resistencia de alto nivel de la cefazolina y la cefuroxima justificaría el aumento de aislamientos en las concentraciones críticas intermedias (1-2  $\mu$ g/ml).

### 1.3.- *Proteus vulgaris*.

El análisis de los patrones de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en los 240 aislamientos de *P. vulgaris* confirma la diversidad fenotípica inferida por la  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase Ic (oxiiminocefalosporinasa o cefuroximasa) (91,231,378,485,503). Descrita inicialmente por Sawai y cols. (518), es específica de esta especie, si bien otras  $\beta$ -lactamasas encontradas en *P. penneri* (198), *P. cepacia* (230,230), *P. pseudomallei* (312) y *X. maltophilia* (497,498) comparten similares características. Estas enzimas de pI que oscila entre 6,9 y 9,5 (21,423) presentan, con independencia de éste amplio rango, unas características cinéticas similares: elevada tasa de hidrólisis ( $V_{max}$ ) para aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ª generación, cefuroxima y oxiiminocefalosporinas

(21,120,423,617). A diferencia del resto de las  $\beta$ -lactamasas de la clase I, son inhibidas por el ácido clavulánico y otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (21,120). El fenotipo de resistencia que confieren en su estado basal, incluye la ampicilina, cefazolina y cefuroxima pero no la cefoxitina, ceftazidima y cefotaxima (342,617). Esta última, a pesar de tener una elevada tasa de hidrólisis, posee una baja afinidad ( $K_m$ ) por lo que sólo se ve afectada por el incremento de la cantidad del enzima, bien por inducción (21,120,354,423,563) o por desrepresión (617,307).

A diferencia de otras series, en las que *P. vulgaris* se presenta siempre como resistente a las aminopenicilinas (537), detectamos en nuestro trabajo un bajo porcentaje de aislamientos sensibles a la ampicilina y resto de los  $\beta$ -lactámicos estudiados (fenotipo I, 2,8%) (TABLA 27). Este fenotipo se correspondería con un nivel basal o nulo de producción de  $\beta$ -lactamasa similar al que se consigue cuando cepas inducibles son tratadas con agentes mutagénicos del tipo de la nitrosoguanidina (121,307). Un aumento en la cantidad del enzima daría lugar a una elevación de los valores de CMI para la ampicilina, cefazolina y cefuroxima, sin afectar a la asociación amoxicilina/clavulánico, ticarcilina, cefoxitina y cefalosporinas de 3ª generación (fenotipo VI, 49,7%) que sería característico de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de *P. vulgaris* (342,378,503,617). El fenotipo VI es el más numeroso y posee resistencia disociada a la ampicilina y la ticarcilina. Mientras que en *E. coli* se relacionaría con la síntesis de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ib (351,503), en *P. vulgaris* pone de manifiesto la ausencia del operón equivalente a *ampC* de *E. coli* que es ocupado por al menos 4 genes no relacionados que participan junto con el operón *frd* en el metabolismo energético (109).

La desrepresión de la  $\beta$ -lactamasa de clase Ic produce un fenotipo similar al que se genera cuando cepas de *P. vulgaris* en su estado inducible son tratadas con agentes inductores, alcanzándose valores de CMI para ticarcilina, amoxicilina/clavulánico y cefotaxima superiores a sus PCR (fenotipo IV). Su incidencia, 10,7%, es superior a la encontrada en estudios previos en nuestro laboratorio (187,188,340), y ha variado a lo largo del sexenio, alcanzando máximos durante los años 1988 y 1990. El estado inducido está limitado por la propia presencia del agente inductor y, particularmente en *P. vulgaris*, por el efecto antibacteriano paradójico que presenta esta especie en relación con algunas cefalosporinas, entre ellas cefotaxima, por el cual sólo a bajas concentraciones del antibiótico inductor se inhibiría el crecimiento bacteriano. Por el contrario, a altas concentraciones se induciría la producción de grandes cantidades de  $\beta$ -lactamasa que inactivarían el antibiótico inductor (245, 246, 503). Con independencia de esta apreciación, el fenotipo IV representaría mayoritariamente las cepas resistentes a la cefotaxima, ya que el fenotipo V (2,9%), que añade resistencia a la cefoxitina y ceftazidima, se correspondería, con toda probabilidad con la superposición de diversos mecanismos: alteraciones en la única porina de esta especie (379),  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (120,356,607), hiperproducción de estas (617) o síntesis desreprimida de la  $\beta$ -lactamasa de clase Ic (617,307).

Considerando el PCR elegido para la cefotaxima ( $\text{CMI} \geq 1 \mu\text{g/ml}$ ), el porcentaje de resistencia, 14,1% (TABLA 9), reflejaría el número de cepas de *P. vulgaris* con la  $\beta$ -lactamasa en estado desreprimido (617,307) junto a aquellas que elevan sus valores de CMI por alteraciones en la membrana externa (379). Si tomamos como referencia los puntos críticos establecidos por el NCCLS (399) ( $\text{CMI} > 8 \mu\text{g/ml}$ ) la resistencia a la cefotaxima sería del 6,1% (TABLA 15), inferior a la encontrada en aislamientos de UCI en Alemania (16%) (522), Bélgica (42%) (587), y más cercano a los valores hallados en Francia (4,0-4,4%) (538). En un estudio multicéntrico realizado en España en 31 hospitales durante 1992 con muestras de UCI, la resistencia a la cefotaxima ( $> 8 \mu\text{g/ml}$ ) en *P. vulgaris* alcanzó un 45% (373).

La producción de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en *P. vulgaris* es menos habitual que en *P. mirabilis* (120,356,607), con porcentajes que oscilan en distintos trabajos entre el 0% (178,304) y un 8,1% (607), siendo TEM-1, -2 (120,356,363,492,607), SHV-1 (363,492) y PSE-2 (492) las únicas enzimas caracterizadas en esta especie. Su codificación, al igual que en el resto de las enterobacterias, confiere resistencia a la ampicilina y ticarcilina dando lugar a los fenotipos II y III. El primero de ellos, de muy baja incidencia (0,6%) compartiría la síntesis plasmídica con un nivel muy bajo de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica que no afectaría a la cefazolina y la cefuroxima. El fenotipo III (31,2%), el más numeroso después del VI, albergaría la mayor parte de las cepas con  $\beta$ -lactamasas plasmídicas y otras con una producción elevada de la cefuroximasas inducible cuya síntesis afectaría parcialmente a la ticarcilina superándose su PCR (188,307).

Por el momento no se han descrito  $\beta$ IPEA *P. vulgaris*. Debemos resaltar que su presencia teórica podría confundirse, sin la realización de oportunos estudios de transferencia y caracterización bioquímica o genética, con la síntesis de las oximiinocefaloporinasas en estado desreprimido. Estas últimas, no sólo elevan los valores de CMI para la cefotaxima y el aztreonam, y en menor medida la ceftazidima, sino que también, al ser inhibidas por el ácido clavulánico, producen una sinergia llamativa en la prueba de doble difusión con disco (observaciones personales no mostradas). Por otra parte, el fenotipo V, en estrecha relación con el VII (TABLA 27), eleva los valores de CMI para la cefoxitina y cefalosporinas de 3ª generación, pudiendo asociarse con alteraciones complementarias de la membrana externa.

En coincidencia con otros estudios (474), el bajo número de cepas aisladas anualmente con respecto a otras especies impide apreciaciones adecuadas en la evolución de la sensibilidad durante el período de estudio.

**1.4.- *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens*.**

El mecanismo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos más importante en este grupo de microorganismos es, por el momento, la producción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase Ia (83,122,144,250,294,296,306,307,308,360,362,378,502,503,507). Bajo este epígrafe se alberga una gran variedad de enzimas en cuanto a sus pI que, generalmente, se encuentran en la zona alcalina aunque algunas puedan enfocar en la zona ácida (90,366,425,502,503). Poseen un perfil de sustrato típico de cefalosporinasa con una tasa de hidrólisis ( $V_{max}$ ) mayor para las cefalosporinas que para las penicilinas (95,213,502). El incremento de la síntesis enzimática puede desarrollarse por un mecanismo de inducción, por lo que se las adjetiva de inducibles, o por fenómenos de desrepresión resultantes de mutación genética (59,95,110,122,195,294,296,306,307,383,418,488,502,506,507,618). Estos dos hechos, en cuyo proceso participan al menos 5 genes, *ampC*, *ampR*, *ampG*, *ampD* y *ampE* y varios mediadores (54,123,233,282,283,295,297,298,299,316,405,416), confieren unos fenotipos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos que se ajustan a patrones generalmente uniformes. No obstante, particularidades de expresión específicas de especie (163,177,194,200,224,266,337,377,425,507,517,521,561,564), la mayor o menor incidencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (13,178,304,356,362,366,491,492,603,607) y la participación de alteraciones de la membrana externa (83,97,125,144,207,208,252,379,408,410,516,576,602), permiten que existan diferencias fenotípicas de un grupo a otro (TABLAS 28-31).

En términos generales, y al igual que en el resto de las enterobacterias, es posible, en función de la actividad de la ampicilina y la ticarcilina, separar 3 grandes grupos. El primero sensible a la ampicilina y ticarcilina, representado por un único fenotipo (I) con un bajo nivel de producción enzimática, un segundo grupo con resistencia disociada que responde con mayor claridad a la producción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas (fenotipos VI y VII) y un tercero con resistencia a ambos antibióticos (fenotipo II-V), donde es más difícil separar los fenotipos debidos a la producción de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de aquellos que confieren las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas.

El primer fenotipo (I) representa una población con un nivel enzimático inapreciable (307) y es similar, fenotípicamente, al que se produce cuando una cepa con una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase Ia se trata con agentes mutagénicos (nitrosoguanidina) que abolen la producción enzimática (121,307,311,616). Este fenotipo, también denominado "basal" es más frecuente en *C. freundii* (18,2%), menos en *E. cloacae* y *E. aerogenes* (10,8% y 7,2%, respectivamente) y de muy baja incidencia en *M. morganii* y *S. marcescens* (1,7% y 1,4%, respectivamente). La presencia de fenómenos inductivos, característicos de estas  $\beta$ -lactamasas (59,122,195,294,296,418,488,503,507), es útil incluso para identificar niveles bajos de expresión enzimática. El mejor ejemplo lo constituye el ácido

clavulánico que, siendo un excelente inhibidor de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas, ejerce un demostrado efecto inductor de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase Ia (162,311,343,556,598), de tal manera que el 4,2% de las cepas de *E. cloacae* "sensibles" a la ampicilina (CMI < 16  $\mu$ g/ml) tienen una CMI para la amoxicilina/clavulánico superior o igual a 16  $\mu$ g/ml.

La  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ia caracteriza, al menos en su estado inducible o con baja producción enzimática, un segundo grupo de aislamientos que poseen resistencia a la ampicilina, amoxicilina/clavulánico y cefazolina y son sensibles a la ticarcilina y cefalosporinas de 3ª generación - fenotipo VI - (122,307,342) (TABLAS 28-31). En nuestra experiencia, y con la excepción de *E. aerogenes*, el mayor porcentaje de los aislamientos pertenece a este fenotipo cuya incidencia varía desde un 72,0% para *M. morganii* hasta el 31,4% para *E. aerogenes*. La acción de agentes inductores, cefoxitina o ácido clavulánico, sobre cepas pertenecientes a este fenotipo eleva la cantidad del enzima (311,384,507) y da lugar, en niveles altos, a un fenotipo similar al que se produce cuando el gen *ampR* (gen regulador de la expresión del gen *ampC*) está permanentemente activado (54,234,300,301,316,416). La producción del enzima es muy elevada, hidrolizándose la cefotaxima, ceftazidima y ticarcilina (fenotipos IV, V). Con respecto a este último antibiótico es necesario señalar que si bien la afinidad de la ticarcilina por la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ia es alta ( $K_m < 1 \mu$ M), su tasa de hidrólisis es muy baja ( $V_{max} < 1 \text{ nmol, min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) por lo que su inactivación sólo se favorece con la desrepresión, donde las concentraciones enzimáticas son muy elevadas (286,502). En ausencia de niveles enzimáticos muy altos, los valores de CMI pueden no incrementarse por encima del PCR (32  $\mu$ g/ml) dando lugar a un fenotipo "sensible" para la ticarcilina y resistente a las cefalosporinas de 3ª generación (fenotipo VII).

Por otra parte, diferencias de afinidad de los metoxi- $\beta$ -lactámicos por las distintas  $\beta$ -lactamasas en las diferentes especies justifican los distintos valores de CMI para la cefoxitina que se obtienen en los fenotipos que responden fundamentalmente a la presencia de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas (fenotipos III al VII). La  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ia de *M. morganii*, a diferencia de lo que sucede en *Enterobacter*, *Citrobacter* y *S. marcescens*, hidroliza débilmente la cefoxitina. La hidrólisis es mayor en *Enterobacter* y *Citrobacter* que en *S. marcescens*, alcanzándose unos valores de CMI superiores. En contraposición a estas diferencias, en todos los casos, la cefoxitina es poco sensible al incremento del enzima (122,307,502,617), no elevándose sustancialmente los valores de CMI con la desrepresión enzimática.

En *M. morganii* la CMI para la cefoxitina posee un valor modal de 8  $\mu$ g/ml (64%) y sólo un 5,9% de las cepas tienen una CMI superior a 16  $\mu$ g/ml, por lo que la mayoría de los aislamientos están incluidos en los fenotipos IV y VI están dentro de la categoría sensible (CMI < 16  $\mu$ g/ml). Los



aislamientos con CMI superiores al PCR elegido (16  $\mu\text{g/ml}$ ) añadirían posibles modificaciones en la membrana externa (379,412). En *S. marcescens*, existe también cierta estabilidad de la cefoxitina frente a la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase Ia. La tasa de hidrólisis es baja por lo que posee una discreta actividad intrínseca (307,502). El PCR elegido (16  $\mu\text{g/ml}$ ) divide la distribución de aislamientos por lo que una parte importante de la población incluida en el fenotipo VI sería "sensible" a la cefoxitina (CMI < 16  $\mu\text{g/ml}$ ) (TABLA 31). Aumentos en la cantidad del enzima, junto con modificaciones en las porinas, elevarían los valores de la CMI por encima del PCR (92,185, 204,208,511,576). La situación que se dibuja en *Enterobacter* y *Citrobacter* con respecto a la cefoxitina es bien diferente; en ambos casos menos de un 10% de los aislamientos son "sensibles" a este antibiótico, demostrando su mayor labilidad a la acción de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas sintetizadas en estos dos géneros (90,307,502,618).

Los resultados obtenidos para la cefuroxima confirman su labilidad a la acción de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase Ia (307,502,617,618). En todas las especies, con la excepción de *S. marcescens* donde casi el 100% de los aislamientos tienen unos valores de CMI superiores a 16  $\mu\text{g/ml}$ , los aislamientos pertenecientes al fenotipo VI son sensibles a este antibiótico. La elevación de la cantidad del enzima, por acción de agentes inductores o por desrepresión de la síntesis de  $\beta$ -lactamasa cromosómica, determina un incremento de la CMI para cefuroxima de 4 a 32 veces (122,342,502). Este mecanismo no es único ya que la síntesis de cantidades elevadas de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (254) puede también comprometer la estabilidad de este antibiótico.

Los fenotipos IV, V y VII, con resistencia a la cefotaxima y ceftazidima mostrarían en conjunto la incidencia de aislamientos con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas establemente desreprimidas. Sin embargo, dentro de los fenotipos V y VII se podrían también encontrar cepas que añaden alteraciones en la membrana externa, elevando los valores de CMI para la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos (83,97,379,408,410,516). La cifra de mutantes con  $\beta$ -lactamasa establemente desreprimida es máxima para *E. aerogenes*, cercana al 40%, mientras que en el resto se sitúa entorno al 20%. Refiriendo los datos a los puntos críticos de resistencia establecidos por el NCCLS (> 8  $\mu\text{g/ml}$ ) (399), el porcentaje de resistencia sería del 5,7% para la cefotaxima y 10,7% para la ceftazidima en *M. morganii*, 17,6% y 16,6%, respectivamente, en *E. cloacae*, 22,3% y 37,1% en *E. aerogenes*, 17,8% y 17,8% en *C. freundii* y 8,6% y 1,4% en *S. marcescens*. En comparación con otros estudios realizados en Estados Unidos (543,606), Inglaterra (304), Francia (538), Bélgica (587), Holanda (84) y Alemania (522) que utilizan los criterios del NCCLS, nuestra tasa de resistencia a cefotaxima es sensiblemente inferior para *M. morganii*, *C. freundii* y *S. marcescens*, y similar para *E. cloacae* y *E. aerogenes*. Los datos obtenidos en otros hospitales españoles (373) están en concordancia con los observados en nuestro hospital para *E. aerogenes* y *S. marcescens* e inferiores a los encontrados en

*M. morganii*, *C. freundii* y *E. cloacae*. Estas diferencias, podrían justificarse por el origen de los aislamientos, en nuestro caso de diferentes áreas de hospitalización y en los estudios referidos de unidades de cuidados intensivos, donde el uso masivo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos ejercería una presión selectiva y facilitaría la selección de mutantes establemente desreprimidos (381,455,512,513).

De los datos reflejados en la distribución de aislamientos para cefotaxima y ceftazidima (TABLAS 21 y 22), tanto en *M. morganii* como en *E. cloacae*, *C. freundii* y *S. marcescens* se observa una mayor afectación de la cefotaxima que de la ceftazidima (fenotipo IV). En sentido opuesto, en *E. aerogenes* la afectación es mayor para la ceftazidima. La explicación de este último hecho no es sencilla ya que a bajas concentraciones tanto la cefotaxima como la ceftazidima poseen una mayor actividad intrínseca en *E. aerogenes* que en *E. cloacae*. Con la desrepresión, y por tanto con mayor cantidad de enzima, los valores de cefotaxima son más elevados en *E. cloacae*, mientras que la ceftazidima se ve más afectada en *E. aerogenes*. Podríamos por tanto catalogar de "más sensible" a *E. aerogenes* que a *E. cloacae* en su estado inducible, si bien la incidencia de mutantes con  $\beta$ -lactamasa establemente desreprimida en el primero es mayor que en el segundo. Además, una menor actividad enzimática específica de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica establemente desreprimida de *E. aerogenes* con respecto a *E. cloacae* (122) determinaría que aún cuando la proporción de mutantes es mayor en *E. aerogenes* estos serían más "sensibles" o, expresado en otros términos, que los valores de las CMI dentro del rango de resistencia fuesen más bajos.

La incidencia de resistencia a la cefotaxima ( $> 2 \mu\text{g/ml}$ ) en 1992 en *M. morganii* (12,4%), *E. aerogenes* (49,1%) y *C. freundii* (20,8%) fue significativamente menor a la observada en 1987. En *E. cloacae* y *S. marcescens*, las cifras máximas de resistencia a este antibiótico se obtuvieron en 1991, 30,5% y 33,9% respectivamente, disminuyendo ambas durante 1992. Es de resaltar, que el consumo de cefalosporinas de 3ª generación en nuestro hospital aumentó progresivamente desde 1987 hasta 1991 y disminuyó durante el último año. Tomando como referencia el valor DDD/100 camas-día (dosis diaria definida referida para 100 camas-día) (413), el consumo de la cefotaxima aumentó desde 0,8 en 1987 a 4,1 en 1991 y disminuyó a 3,0, cerca del 25%, en 1992. Los valores correspondientes para la ceftazidima fueron de 0,9 en 1987, 1,4 en 1991 y 1,0 en 1992 (datos del Grupo de Trabajo en Política de Antimicrobianos del Hospital Ramón y Cajal), por lo que la presión selectiva ejercida por el consumo de antimicrobianos podría haber disminuido determinando un menor número de cepas con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas establemente desreprimidas.

La codificación de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en estos géneros no es tan frecuente como en el grupo formado por *E. coli*, *Salmonella spp.* y *P. mirabilis* (13,178,242,304,356,366,492,607). La

diferenciación fenotípica de los aislamientos con estas enzimas no es sencilla y sólo el alto nivel de resistencia a carboxi- y acilureido-penicilinas facilitaría su identificación presuntiva (254,342,363).

La baja frecuencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro en *M. morganii* (531,607) y la escasa referencia en otros estudios a la codificación de BIPEA en esta especie (252,322) explicaría que entre los 595 aislamientos estudiados no hallamos encontrado cepas con producción de estas enzimas. Estos datos estarían en concordancia con lo publicado recientemente por Sirot y cols. (538) en un amplio estudio multicéntrico en el que no identificaron cepas de *M. morganii* productoras de BIPEA. Por el contrario, la incidencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en *Enterobacter*, *Citrobacter* y *S. marcescens* es algo mayor, siendo TEM-1 la más frecuente (178,356,362,491,492,607). Estos dos hechos incidirían en una mayor presencia de las BIPEA en estas especies y que sean precisamente aquellas derivadas de TEM las que han sido caracterizadas con mayor asiduidad (128,125,206, 252,453,539), aunque también las de tipo SHV pueden estar presentes (280,167,452,451).

En nuestra experiencia, entre los 520 aislamientos clínicos de *C. freundii* estudiados durante el período comprendido entre 1987 y 1992 no identificamos cepas con BIPEA. Por el contrario, se aisló una cepa de *C. freundii* con resistencia transferible a la cefotaxima y la ceftazidima en las muestras de portadores fecales cuyo enzima responsable SHV-2 se caracterizó en el transconjugante. En *Enterobacter*, sólo se pudo constatar la presencia de BIPEA en 2 aislamientos de los 5.822 estudiados, el primero de ellos, una cepa de *E. cloacae*, aislado en el contexto de la única epidemia por BIPEA descrita en nuestro hospital y el otro un aislamiento poco frecuente, *E. gergoviae*, con una  $\beta$ -lactamasa de pI, perfil de sustrato y sensibilidad característico de SHV-2. Por último, sólo una cepa de *S. marcescens* de las 1.060 estudiadas codificaba una BIPEA, presentando un perfil de sustrato característico de TEM-4.

La codificación de las BIPEA, que confieren resistencia a la cefotaxima y ceftazidima, podría fenotípicamente confundirse en este grupo de microorganismos con la producción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles. Su diferenciación fenotípica será factible, en primer lugar, con el análisis de la sensibilidad a carboxi- y acil-ureido penicilinas que tendrán unos valores anormalmente altos característicos de la producción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica (254,363) y en segundo lugar, por la sinergia de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas con las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam.

Este grupo de microorganismos supone un ejemplo de la adaptación de las bacterias a la presión selectiva ejercida por el uso masivo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, siendo cada vez más frecuente constatar la adquisición de mecanismos de resistencia más eficaces que pueden, incluso, solaparse entre sí. En un trabajo, recientemente publicado, que analizaba distintos aislamientos de

*E. aerogenes* procedentes de UCI (125) se demostró que eran resistentes a las cefalosporinas de 3ª generación por desrepresión enzimática, resistentes al imipenem por alteraciones en la membrana externa y que codificaban además una  $\beta$ -lactamasa plasmídica de amplio espectro (TEM-1) y/o una BIPEA (CAZ-6 ó TEM-3). Estos hallazgos determinan perfiles con resistencias múltiples por lo que la individualización fenotípica de los distintos mecanismos implicados no es tan evidente como en las cepas que responden a un solo determinante genético de resistencia.

## 2.- IDENTIFICACION Y AGRUPAMIENTO FENOTIPICO DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

El análisis del fenotipo de sensibilidad-resistencia frente a un grupo de antibióticos de una misma familia facilita, al amparo de la lectura interpretativa propugnada por Courvalin (116), una aproximación a los mecanismos bioquímicos de resistencia que los generan y a los determinantes genéticos que los codifican. El perfil fenotípico en *Enterobacteriaceae* que incluye resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación y monobactámicos y sensibilidad a la asociación de penicilinas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefamicinas y carbapenems constituye un indicio claro de la presencia de las BIPEA (oxiimino- $\beta$ -lactamasas) (252). Asimismo, la sinergia entre el ácido clavulánico y las cefalosporinas de 3ª generación o el aztreonam facilita la identificación inicial de estas enzimas (259). En la actualidad, existen más de 40 BIPEA derivadas o relacionadas con TEM-1,2 y SHV-1 que responden, en términos generales, a este perfil de resistencia (252) (TABLA 4). Una vez diferenciado el fenotipo de resistencia que caracteriza globalmente las BIPEA es necesario realizar un análisis fenotípico más preciso que contribuya, dentro de sus posibilidades, a la individualización de estas enzimas.

La expresión fenotípica de una BIPEA varía según la especie de *Enterobacteriaceae* donde se presente (278). Además el fenotipo que determina puede superponerse con aquel que genera otra  $\beta$ -lactamasa. Por ello, la presencia de las BIPEA en cepas con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase I en estado desreprimido condiciona su identificación a la realización de ensayos de transferencia plasmídica y al análisis de los transconjugantes obtenidos. El estudio fenotípico de 7 prototipos de BIPEA de tipo TEM (TEM-3,4,5,6,7,8, y 12) y 5 de tipo SHV (SHV-2,3,4,5, y 6) (TABLA 32 y 33), utilizando la misma cepa de *E. coli* como hospedador de los plásmidos que las codifican, nos ha permitido agrupar las distintas enzimas que responden a fenotipos comunes, evitando la posible influencia de la cepa que las alberga.

El primer grupo fenotípico, grupo I, incluye las enzimas que confieren un nivel de resistencia muy similar para la ceftazidima, aztreonam y cefotaxima (4-32  $\mu\text{g/ml}$ ): TEM-3, TEM-4, SHV-2 y SHV-3. Estas cuatro enzimas están incluidas dentro del grupo 3 de **Payne y Amyes** (438) que se caracteriza por hidrolizar con mayor eficiencia la cefotaxima que la ceftazidima, si bien, la peor entrada de esta última al espacio periplásmico (410) determina que sus valores de CMI sean muy similares a los de la cefotaxima. Asimismo, el grupo I es coincidente con el denominado fenotipo CTX o "cefotaximasa" definido por **Philippon** (17,453). Este grupo de enzimas es homogéneo cuando se aplica el ensayo de la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín (434). El perfil competitivo de TEM-3 y TEM-4 de una parte, así como el de SHV-2 y SHV-3 por otra, es indistinguible, siendo necesario recurrir a la determinación del pI para diferenciarlas o al análisis fenotípico de otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos (TABLA 32 y 33).

Las enzimas de los grupos II (TEM-6, SHV-4 y 5) y III (TEM-5,7,8,12 y SHV-6) son agrupadas por **Philippon** (17,453) como "ceftazidimasas", denominándose fenotipos CAZb y CAZa, respectivamente. El primero de ellos muestra valores de CMI muy similares para la ceftazidima y el aztreonam (32-64  $\mu\text{g/ml}$ ), distanciándose de los de cefotaxima (0,5-16  $\mu\text{g/ml}$ ). En el segundo, los valores de la ceftazidima (16-64  $\mu\text{g/ml}$ ) son más altos que los del aztreonam (0,5-8  $\mu\text{g/ml}$ ) y éstos que los obtenidos para la cefotaxima (0,5-1  $\mu\text{g/ml}$ ). Ambos fenotipos no se ajustan a los grupos definidos por **Payne y Amyes** (438), ya que algunas de las  $\beta$ lactamasa agrupadas fenotípicamente se separan al utilizar como criterio los valores de eficiencia hidrolítica de la ceftazidima y la cefotaxima.

El agrupamiento fenotípico no puede justificarse, en términos moleculares, por una sola sustitución en la secuencia de aminoácidos de las enzimas de las que derivan. Las  $\beta$ lactamasa incluidas en el grupo I, TEM-3,4, SHV-2 y 3 presentan un cambio en la posición 236, serina por glicina, que eleva la CMI para la cefotaxima (547). Asimismo, SHV-4 y 5, del grupo II, y TEM-8, del grupo III, también muestran este cambio, si bien añaden otras modificaciones que les confieren aspectos particulares (TABLA 3). Es de resaltar que TEM-8, aún teniendo la sustitución de la serina por la glicina-236, sólo alcanza un valor de CMI de 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  para la cefotaxima. Esta enzima posee además una mutación en la posición 102, lisina por glutámico, que eleva, al igual que en las enzimas TEM-3 y TEM-4, el valor de la CMI para la ceftazidima (547,551). No obstante, la confluencia en TEM-8 de las sustituciones que afectan a los residuos 236 y 102 y la presencia de otra mutación en la posición 162, serina por arginina, influye en los valores más bajos de la cefotaxima con respecto a los que confieren otras  $\beta$ lactamasa. Todas las enzimas del grupo III, incluida TEM-8, muestran el cambio serina por arginina en la posición 102, no alcanzándose un valor de CMI para la cefotaxima superior a 1  $\mu\text{g/ml}$  (TABLA 32 y 33). Asimismo, considerando los datos de

sensibilidad de otras enzimas con esta mutación (322,401), TEM-9, TEM-10 y TEM-26 (YOU-1) podrían quedar incluidas por sus valores de CMI para la cefotaxima (1-2  $\mu\text{g/ml}$ ) dentro del grupo III (252,481) y sin embargo se agrupan en el II, ya que al igual que TEM-6 muestran unos valores de CMI muy similares para la ceftazidima (64-128  $\mu\text{g/ml}$ ) y el aztreonam (32-128  $\mu\text{g/ml}$ ) (42,252,481).

Un fenotipo nuevo, fenotipo ATM, recientemente establecido por Arlet y cols. (18) se caracteriza por una CMI para el aztreonam superior a la de ceftazidima y ambas por encima de la obtenida para la cefotaxima. Por el momento, la única representante con estas características es la enzima TEM-22, cuya secuencia nucleotídica se desconoce. Su estudio bioquímico reveló una tasa de hidrólisis baja para la cefotaxima, la ceftazidima y el aztreonam comparada con las obtenidas con la BIPEA TEM-3. Sin embargo, la elevada afinidad de la enzima TEM-22 por el aztreonam justifica los valores de CMI alcanzados para este antibiótico.

Por otra parte, el agrupamiento fenotípico de las BIPEA sólo puede establecerse cuando en el estudio de sensibilidad se utiliza un amplio rango de concentraciones. Generalmente, los sistemas automáticos o semiautomáticos de microdilución, entre ellos el sistema PASCO, emplean un número reducido de concentraciones por lo que la observación de grupos fenotípicos está ampliamente limitada (FIGURAS 4 y 5). Asimismo, el bajo número de concentraciones impide la individualización fenotípica, que se facilita con el empleo de un amplio rango de concentraciones con el sistema clásico de dilución en agar o con el sistema comercial E-test. Ambas técnicas nos han permitido definir grupos fenotípicos en función de los valores de CMI para la ceftazidima, el aztreonam y la cefotaxima y definir características individuales para cada enzima.

Las dificultades en la detección de ciertos aislamientos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA por los modernos sistemas automáticos o semiautomáticos de identificación y determinación de CMI, ha sido previamente descrita (168,172,428). Sin embargo, la lectura interpretativa de los resultados de sensibilidad obtenidos con el sistema semiautomático PASCO nos permitió, en combinación con la prueba de doble difusión con disco descrita por Jarlier y cols. (259), una adecuada identificación presuntiva de las cepas clínicas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA. Por el contrario, la individualización fenotípica requirió la utilización de la dilución en agar con un rango amplio de concentraciones.

Al unísono con otros estudios (167,291,451), es de resaltar que la aplicación de los criterios establecidos por el NCCLS (399,400) a los datos obtenidos por el sistema semiautomático PASCO categorizó erróneamente como "sensibles" un alto porcentaje de los aislamientos con BIPEA: 55% para la cefotaxima y 30% para la ceftazidima (FIGURA 8). La ampliación del rango de

concentraciones por dilución en agar y la consideración de unos criterios más restrictivos (TABLA 7) redujo este porcentaje a un 5% para la cefotaxima y un 2,5% para la ceftazidima, siendo un 0% cuando se consideraron ambos antibióticos simultáneamente. La aplicación de los criterios del NCCLS para la difusión por disco (398,400) habría categorizado erróneamente estas cepas como "sensibles" a la cefotaxima en un 48,7% y en un 40,0% para la ceftazidima, siendo clasificadas como "moderadamente sensibles" un 41,2% y un 8,7%, respectivamente. Por tanto, la baja expresión de las  $\beta$ IPEA dificultaría la detección en el laboratorio de las cepas con estas enzimas, y en particular si se estudian frente a una única cefalosporina de 3ª generación. Sólo un amplio rango de concentraciones de antibiótico y la demostración de las pequeñas elevaciones de CMI que con frecuencia determinan estas enzimas (251,252) facilitarían su identificación presuntiva. En un trabajo reciente, Meyer y cols. (374) constataron que la demora de un año entre el aislamiento de una cepa de *K. pneumoniae* productora de  $\beta$ IPEA y la identificación del brote epidémico que había generado, se debía a una interpretación estricta de los criterios NCCLS y al empleo de un solo antimicrobiano como marcador de la resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación.

Es un hecho constatado que, en ocasiones, la detección de las  $\beta$ IPEA se ha favorecido por su presencia en cepas con alteraciones en la permeabilidad (89), elevándose las CMI para las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam (205,582). En nuestra experiencia la expresión de las distintas  $\beta$ IPEA (TEM-3,4,5,6,7,12 y SHV-2,3,4,5,6) en dos cepas isogénicas de *E. coli*, una de ellas *ompF*<sup>-</sup>, incrementó los valores de CMI para todos los  $\beta$ -lactámicos, siendo la cefpiroma la cefalosporina menos afectada (FIGURA 7). Este dato puede explicarse por la mejor penetración y más rápido acceso de la cefpiroma al espacio periplásmico en comparación con la cefotaxima o la ceftazidima (411), de tal forma que las alteraciones en la membrana externa afectarían en mayor medida a estas dos últimas cefalosporinas.

Por otra parte, la simultánea elevación de los valores de CMI para las cefalosporinas de 3ª generación y las cefamicinas en las cepas *ompF*<sup>-</sup> dificultaría la diferenciación fenotípica de las  $\beta$ IPEA de tipo TEM y SHV de las cefamicinasas. Estas últimas confieren unos valores de CMI incrementados para la cefoxitina (64- > 128  $\mu$ g/ml), el cefotetan (2-128  $\mu$ g/ml) y el moxalactam (2- > 128  $\mu$ g/ml). En nuestra experiencia la ausencia de la porina *OmpF* (FIGURA 6) en *E. coli*, sólo elevó parcialmente estos valores (2-4 diluciones) por lo que sería necesaria la presencia de otras mutaciones para modificar las CMI de las cefamicinas a un nivel similar al que confieren las cefamicinasas. En las cepas de *K. pneumoniae* con  $\beta$ IPEA de tipo TEM o SHV y alteraciones en la membrana externa, el incremento descrito para la cefoxitina (32-128  $\mu$ g/ml) (205,433,582) es similar al obtenido habitualmente con las cefamicinasas (TABLA 4) (40,435,445,577), valores alejados de los encontrados por nosotros en las cepas de *E. coli ompF*<sup>-</sup> con  $\beta$ IPEA (4-8  $\mu$ g/ml).

La asociación del ácido clavulánico con la amoxicilina fue menos efectiva en las cepas de *E. coli ompF<sup>-</sup>* (8/4-16/8 µg/ml) con BIPEA que en las cepas *ompF<sup>+</sup>* con estas mismas enzimas (16/8-32/16). No obstante, los niveles de CMI fueron inferiores a los que se obtendrían con las cefamicinasas (128/64- > 256/128 µg/ml) (40,45,236,435,445,577), siendo más cercanos a los valores descritos para las enzimas de tipo TEM con resistencia a los inhibidores de β-lactamasas (β-lactamasas IRT) (32/16-64/32 µg/ml) (48,66,569). Asimismo, la elevación de los valores de CMI de las cefalosporinas de 3ª generación en las cepas con problemas de permeabilidad facilitaría la detección de las cepas con BIPEA. Por el contrario, la disminución de la actividad del ácido clavulánico la dificultaría puesto que sería menor la sensibilidad de la clásica prueba de la doble difusión con disco (259) que manifiesta la ampliación de los halos de inhibición de las cefalosporinas de 3ª generación con la aproximación de un disco estandar de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg). Sin embargo, la reducción de la distancia entre los discos favorece la demostración de la sinergia (datos no mostrados).

### 3.- β-LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO EN *Enterobacteriaceae* EN EL HOSPITAL RAMON Y CAJAL (1987 - 1992).

La descripción por Knothe y cols. (280) en 1983 de tres cepas de *K. pneumoniae* y una de *S. marcescens* con resistencia transferible a las cefalosporinas de 3ª generación suscitó un rápido interés por las BIPEA, unido a un cierto temor del peligro que podría derivarse de su diseminación. La localización de estas enzimas en plásmidos fácilmente transferibles (255), su aparición en numerosas ocasiones en forma de epidemias (508) y la constatación de que su presencia está ligada al amplio uso de antibióticos β-lactámicos como la cefotaxima, ceftazidima o ceftriaxona (80,539) hizo pensar en una rápida dispersión similar a la que había acontecido con la enzima TEM-1. Sin embargo, sólo una de estas β-lactamasas, SHV-2, ha logrado sobrepasar barreras geográficas y distribuirse a nivel mundial (508); un número reducido, SHV-5, TEM-6 y TEM-10, se ha aislado en al menos 10 países (3,252,508) y el resto quedan circunscritas a un solo Hospital, Servicio o Unidad e incluso a un único paciente (252,438,508).

El seguimiento prospectivo de todos los aislamientos clínicos de *Enterobacteriaceae* del Hospital Ramón y Cajal desde marzo de 1987 hasta diciembre de 1992 nos ha permitido identificar 80 cepas con BIPEA, indicando una incidencia cercana al 0,4% sobre el total de aislamientos de *Enterobacteriaceae* (80/24.058), inferior a la descrita por otros autores(508). En un estudio multicéntrico realizado en Francia desde 1988 a 1990, que recogía todas las cepas de *Enterobacteriaceae* aisladas en el segundo trimestre de cada año en 12 hospitales, se demostró una



incidencia media del 1,5% (538). Una experiencia más limitada realizada en 14 hospitales españoles durante los años 1989, 1990 y 1991, en la que se analizó exclusivamente la resistencia a la cefotaxima de 4.029 aislamientos consecutivos de *Enterobacteriaceae* recogidos durante un período de 15 días, detectó 39 cepas supuestamente productoras de BIPEA, indicando una incidencia del 0,9% (3,106,165). En este estudio, y al igual que en el realizado en Francia (538), en algunos hospitales no se detectaron cepas con BIPEA. Por el contrario, el elevado número de aislamientos con BIPEA en centros incluidos en el estudio francés denotaba la presencia de brotes epidémicos.

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre cepas productoras de BIPEA reflejan su incidencia en un corto período de tiempo y, con frecuencia, en el contexto de una epidemia (508), por lo que los valores medios comunicados son siempre superiores a los encontrados por nosotros. Asimismo, es relativamente habitual que estos trabajos se limiten exclusivamente a áreas concretas de hospitalización, generalmente unidades de cuidados intensivos, y a la identificación de estas enzimas en el género *Klebsiella* o en cepas de *E. coli*, que son los que poseen con mayor asiduidad este mecanismo de resistencia (252,259,374,451,568). Este planteamiento impide conocer la prevalencia real de *Enterobacteriaceae* con BIPEA que varía, por los datos recogidos de la literatura, desde menos del 1% hasta un 74% de la cepas estudiadas (252,508).

En Francia se han realizado desde 1985 diferentes trabajos multicéntricos tendentes a estudiar la evolución del número de cepas con BIPEA, refiriéndose la mayoría a *K. pneumoniae*. En 1985 la incidencia en esta especie era inferior al 1%, elevándose hasta el 11% en 1988 (568). Referencias más recientes indican que en 1990 la incidencia de cepas de *K. pneumoniae* con BIPEA fue superior al 14% (538). En nuestro hospital y de forma retrospectiva, se detectó un número muy limitado de cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* entre 1980 y 1986 con un fenotipo de resistencia que hacía presuponer la presencia de BIPEA (319). De forma prospectiva, en el presente estudio, se detectaron las primeras cepas con BIPEA en 1988: 3 cepas de *E. coli* aisladas en 2 pacientes de la Unidad de Cardiología Pediátrica que representó una incidencia anual inferior al 0,1% y la primera constatación de este mecanismo en España (28). El máximo número de aislamientos correspondió al año 1989 con 35 cepas (24 *S. arizonae*, 8 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* y 1 *E. cloacae*), representando una incidencia del 0,8%. Durante los dos últimos años, 1991 y 1992, este porcentaje ha sido del 0,2%, sensiblemente inferior a la media, no habiéndose constatado modificaciones en la tendencia durante 1993 (datos de este último año no incluidos).

Si exceptuamos el alto porcentaje de aislamientos de *S. arizonae* (31,2%), que estuvo asociado a la única epidemia por cepas con BIPEA surgida en nuestro hospital, la distribución en cuanto a especies (TABLA 50, FIGURA 27) es similar a la encontrada por otros autores

(252,451,508). *K. pneumoniae* fue la especie con mayor número de aislamientos (33,8%), seguida de *E. coli* (31,2%) y *S. arizonae* (31,2%). Es de resaltar que, a diferencia de otros estudios epidemiológicos (167,252,451,508), no se aislaron cepas de *K. pneumoniae* con BIPEA de tipo TEM y no encontramos cepas de *K. oxytoca* con resistencia a cefalosporinas de 3ª generación mediada por BIPEA. Por el contrario, la identificación y caracterización de una BIPEA en una cepa de *E. gergoviae* constituiría el primer aislamiento de este tipo de enzimas en esta especie.

Por otra parte, el número de pacientes implicados, 44, manifiesta una baja incidencia y, en general, una repercusión epidemiológica de escasa relevancia. No obstante, es de destacar que el 75% de los pacientes estaba relacionado con servicios quirúrgicos o unidades de cuidados intensivos (TABLA 50, FIGURA 28). Esta mayor proporción justifica que un 31,6% de las cepas se obtuviesen de muestras respiratorias, aunque al igual que en otros trabajos (19,259,291,374) un alto porcentaje se aisló en orinas (22,4%). El mayor número de cepas procedentes de heces (14,5%) con respecto a otros estudios (451,538,568) se debió a su búsqueda en la flora intestinal en los controles epidemiológicos efectuados durante la epidemia por *S. arizonae*. La constatación de este hecho reafirmaría el papel de reservorio ejercido por el tracto intestinal y la necesidad de realizar una decontaminación selectiva como medida epidemiológica encaminada a la erradicación de este tipo de cepas (81,127), puesto que su permanencia en la flora intestinal puede prolongarse incluso después del alta clínica del paciente. Al igual que en otros trabajos (167,473), un número reducido de cepas fue aislado en pacientes procedentes de la comunidad (4 enfermos), constatándose que al menos uno de ellos había estado previamente ingresado en el hospital. Asimismo, en el estudio de portadores fecales se aislaron 7 cepas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA en 5 pacientes, uno de ellos ingresado y el resto pacientes ambulatorios que previamente habían estado en el hospital durante un período prolongado de tiempo ( $21 \pm 8$  días). La persistencia de este tipo de microorganismos en la flora normal de los pacientes podría justificar su frecuente aparición en áreas concretas de hospitalización durante todo el período de estudio: unidades de cuidados intensivos y servicios quirúrgicos. A este respecto, un 68,2% de los pacientes pertenecía a la misma unidad de Cardiología Pediátrica, aislándose en ellos un número elevado de cepas (25) con la misma BIPEA (SHV-2) a lo largo del tiempo de estudio.

La estancia media de los pacientes con aislamientos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA ( $49,1 \pm 28,9$  días) fue considerablemente superior a la media de nuestro hospital durante el mismo período de estudio (12,9 días) y similar a la encontrada por otros autores para este tipo de pacientes (19,167). Es de resaltar que el tiempo transcurrido desde el ingreso hasta la obtención de un aislamiento con BIPEA en estos pacientes (24,6 días) duplicó la estancia media de nuestro hospital. Este largo período de tiempo favorecería tanto la colonización del paciente con este tipo de

microorganismos como la selección ejercida por el tratamiento antibiótico (481). En nuestra experiencia, el 10% de los pacientes no cumplía criterios de infección (74) y sólo un paciente del total no había recibido tratamiento antibiótico previo al aislamiento de la cepa productora de  $\beta$ IPEA.

La selección de cepas con  $\beta$ IPEA ha sido demostrada "in vitro" mediante el crecimiento de cepas con  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM-1, TEM-2 ó SHV-1 sobre medios selectivos con cefotaxima o ceftazidima (438), presentando las enzimas identificadas idénticas características que  $\beta$ -lactamasas de igual pI obtenidas "in vivo". La administración prolongada de cefalosporinas de 3ª generación, generalmente en asociación con aminoglicósidos, constituye una de las causas más estrechamente relacionadas con la aparición de estas enzimas (19,80,259,481). Chanal y cols. (129) han demostrado la posibilidad de aparición de una nueva  $\beta$ IPEA, CAZ-6 (TEM-24), a partir de otra ya existente, TEM-3, en un paciente tratado con una cefalosporina de 3ª generación, reafirmando el papel selector del tratamiento antibiótico previo. En nuestra experiencia, cada paciente recibió una media de  $3,2 \pm 1,5$  antibióticos, evidenciándose que el 82,5% de los pacientes recibió al menos una cefalosporina de 3ª generación, en asociación con un aminoglicósido en el 42,4%. No se demostró relación entre el tipo de antibiótico  $\beta$ -lactámico administrado, cefotaxima o ceftazidima, y la enzima caracterizada,  $\beta$ IPEA de tipo TEM o SHV. Asimismo, con una alta frecuencia los plásmidos que codifican las  $\beta$ IPEA presentan también genes de resistencia a aminoglicósidos (255,259,449,451,532,541), por lo que el tratamiento combinado de cefotaxima o ceftazidima con un aminoglicósido podría favorecer la selección de estas cepas. El 97,5% de las cepas con  $\beta$ IPEA aisladas en nuestro hospital eran resistentes simultáneamente a aminoglicósidos, encontrándose presente otros marcadores de resistencia como sulfamidas, tetraciclinas y trimetoprim (TABLA 46).

Por otra parte, el aumento del consumo de antibióticos en un hospital (374) o en áreas concretas de hospitalización (401) también ha sido relacionado con el aislamiento de estas enzimas. Meyer y cols. (374) demostraron que el consumo de ceftazidima se había incrementado un 600% durante los dos años previos a la aparición de una epidemia por *K. pneumoniae* productora de  $\beta$ IPEA en su hospital. En nuestro estudio, sólo tres de los nueve pacientes involucrados en la epidemia por *S. arizonae* con resistencia a la ceftazidima habían recibido previamente cefalosporinas de 3ª generación. Sin embargo, se pudo constatar que, durante los 6 meses anteriores al aislamiento de las cepas resistentes, el consumo de ceftazidima se había incrementado en un 76,9% con respecto al mismo período del año anterior.

El tratamiento antibiótico instaurado tras el informe microbiológico que identificaba el agente causal de la infección fue adecuado a la sensibilidad que presentaban las cepas con las  $\beta$ IPEA en el 87,8% de los pacientes e incluía imipenem (solo o en asociación con un aminoglicósido) (78,7%),

fluorquinolonas o cefoxitina más amicacina. Por el contrario, en 4 pacientes se pautó, a pesar del mecanismo de resistencia inherente, un tratamiento con cefalosporinas de 3ª generación, objetivándose, con independencia del nivel de sensibilidad a estos antibióticos, una evolución desfavorable de los pacientes. El cambio terapéutico por imipenem determinó la evolución favorable en tres de ellos, falleciendo otro paciente aunque por causas ajenas a la infección. El empleo de carbapenems podría incidir en una disminución de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* con BIPEA. Sin embargo, la restricción del uso de cefalosporinas de 3ª generación e implantación de pautas con imipenem ha sido relacionado con la aparición de infecciones por *Acinetobacter* multirresistente (374).

El largo período de seguimiento de casi 6 años nos ha permitido, además de conocer la incidencia real de las BIPEA en nuestro hospital, la identificación y caracterización de diversos tipos de enzimas: un primer grupo de *Enterobacteriaceae* con BIPEA de pI de 7,6, SHV-2 y SHV-6; un segundo grupo con enzimas de pI 5,9, TEM-4 y TEM-6/8 y un tercero representado por una BIPEA de tipo TEM con un pI de 5,4.

SHV-2 fue la BIPEA más frecuentemente caracterizada tanto con respecto al número de cepas estudiadas, 35 (43,7%), como de los pacientes en que se aisló, 25 (56,8%). Esta enzima, de distribución universal, ha sido identificada en al menos 14 países (508). En España se ha asociado tanto a brotes aislados (3,106,496) como a epidemias nosocomiales (167, Liñares comunicación personal), siendo la primera BIPEA detectada en nuestro país (28). En nuestra experiencia esta enzima siempre surgió en pequeños brotes muy limitados que no afectaron a más de dos o tres enfermos simultáneamente aunque, epidemiológicamente, es de resaltar que el 72% de los pacientes en los que se aislaron *Enterobacteriaceae* productoras de SHV-2 pertenecían a la misma Unidad de Cardiología Pediátrica.

La diseminación de las cepas con BIPEA se ha relacionado con su presencia en plásmidos de carácter transferible, responsabilizándose a un mismo plásmido de una o varias epidemias (167,401,481). En un paciente de la Unidad de Cardiología Pediátrica se aisló, simultáneamente en una muestra respiratoria, una cepa de *K. pneumoniae* y otra de *E. coli* con el mismo perfil de sensibilidad e iguales bandas en el isoelectroenfoque (7,6 y 5,4). La caracterización en estas cepas y en sus respectivos transconjugantes de las mismas  $\beta$ -lactamasas, SHV-2 y TEM-1, e igual enzima modificante de aminoglicósidos, AAC(3)V<sup>GL</sup>, indicaría la transferencia "in vivo" de los genes de resistencia que las codifican. Esta hipótesis ha sido constatada por otros autores para diversas enzimas de tipo TEM: TEM-3 (16), TEM-12 (255) y CAZ-7 (TEM-16) (532) en las que se ha demostrado su asociación a transposones (227,325,532). La posibilidad de transferencia "in vivo" de

las BIPEA de tipo SHV ha sido previamente documentada en España (167), sin que hasta la fecha existan referencias que indiquen la capacidad de transposición de los genes que las codifican. La frecuencia de transferencia de la resistencia por conjugación fue de  $2 \times 10^{-7}$  a  $10^{-4}$  (moda  $10^{-6}$ ), similar a la detectada por otros autores para este tipo de enzimas (279).

Es un hecho incuestionable que las BIPEA han surgido a partir de modificaciones de ciertas bases en los genes que determinan la síntesis de secuencias enzimáticas clásicas, TEM-1,2 y SHV-1 (279,548). En ocasiones, estas mutaciones afectan a un solo aminoácido (252) condición suficiente para modificar y ampliar el espectro hidrolítico de aquellas de las que proceden (94,288). No obstante, se suelen acompañar de una cierta pérdida de eficacia hidrolítica y disminución de la actividad enzimática (89). Este hecho no explicaría, prescindiendo de otros factores como la permeabilidad (89,205,582), el rango de valores de CMI para determinadas cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam con el que puede expresarse un mismo enzima. En nuestra experiencia, una misma  $\beta$ -lactamasa de pI 7,6 (SHV-2), confirió en una colección de 24 cepas de *K. pneumoniae* un rango de CMI para cefotaxima de 1 a 64  $\mu\text{g/ml}$ , de 0,5 a 32  $\mu\text{g/ml}$  para ceftazidima, de 2 a 32  $\mu\text{g/ml}$  para ceftriaxona, de 0,1 a 16  $\mu\text{g/ml}$  para cefpiroma y de 0,5 a 16 para aztreonam (TABLA 34). El número relativamente elevado de cepas estudiadas con estas características - 24 -, nos ha permitido establecer una relación lineal entre la CMI de la ceftazidima (coeficiente de correlación lineal,  $r=0,745$ ) o la cefotaxima ( $r=0,638$ ) y la actividad enzimática específica, incrementándose la CMI para ambos antibióticos al aumentar la actividad enzimática (FIGURA 14). Esta observación, evidenciada anteriormente para TEM-1, TEM-2 y OXA-1 (254,349) y las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase Ia (311,502), no ha sido previamente demostrada para las BIPEA. En nuestro caso, a diferencia de las anteriores en las que se producen aumentos de actividad enzimática de hasta 100 veces (254), el factor de elevación fue inferior a 10. La enzima SHV-2 en estos aislamientos se acompañaba siempre de otra enzima plasmídica, TEM-1, que podría influir en los resultados obtenidos. Sin embargo, la hiperproducción de TEM-1 condiciona un mayor incremento de la actividad enzimática y está generalmente determinada por su presencia en plásmidos multicopia (339,395), posibilidad que no debe tenerse en consideración con las BIPEA debido al mayor tamaño de los plásmidos que las codifican (255).

Por otra parte, podría formularse una hipótesis que estableciera una interrelación entre la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* o los "genes que la regulan" y la BIPEA SHV-2, puesto que ambas pertenecen a la misma clase molecular y presentan una elevada homología entre sí (34,180,238,372,406,420,529). Recientemente, Wu y cols. (613) han postulado la posible dependencia de la enzima KH, BIPEA relacionada con la  $\beta$ -lactamasa K1 de *K. oxytoca*, de los genes cromosómicos de la cepa de *K. oxytoca* que la alberga, objetivándose una actividad enzimática en los

transformantes en *E. coli* 10 veces menor que la obtenida en la cepa salvaje. En nuestra experiencia, se midió la actividad enzimática en 15 transconjugantes en *E. coli* que presentaban al igual que las cepas donantes de *K. pneumoniae* las dos  $\beta$ -lactamasas, SHV-2 y TEM-1. El valor medio de la actividad enzimática,  $0,849 \pm 0,27$  mU/min/mg proteína, fue similar al obtenido con las 24 cepas de *K. pneumoniae*,  $0,892 \pm 0,27$  mU/min/mg, si bien los coeficientes de correlación con la CMI de ceftazidima ( $r=0,552$ ) y cefotaxima ( $r=0,427$ ) fueron más bajos, posiblemente debido al menor número de cepas estudiadas. Otra hipótesis podría estar en relación con los trabajos de Podbielski y cols (464) que demuestran que diferentes promotores pueden modular la expresión de la enzima SHV-2, alcanzándose distintos valores de CMI para la cefotaxima (rango 4- > 128  $\mu\text{g/ml}$ ). Asimismo, se ha constatado que algunas enzimas denominadas igualmente SHV-2 presentan otras modificaciones además de la sustitución responsable de sus características cinéticas, serina por glicina en el residuo 236 (TABLA 3) (180,463). Algunas de estos cambios se sitúan en el péptido líder de tal manera que podrían afectar la expresión final de la BIPEA al modificarse los procesos de maduración y secreción enzimática. Por último, no debería tampoco descartarse la posibilidad de una duplicación de los genes *bla*, hipótesis demostrada sólo para las BIPEA con la enzima SHV-3 (407).

La utilización del perfil de sensibilidad, sinergia con los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, determinación del pI y transferencia de la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación útil en la identificación de la enzima SHV-2, fue insuficiente para la enzima SHV-6, siendo imprescindible la inclusión de otras técnicas, hibridación con sondas de ADN y determinación del perfil de sustrato en función de la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín (434). Dos cepas de *E. coli* y otra de *K. pneumoniae* con una banda de pI 7,6, mostraron unos valores de CMI (TABLA 35) para ceftazidima (4-32  $\mu\text{g/ml}$ ) y aztreonam (1-4  $\mu\text{g/ml}$ ) similares a los que confiere SHV-2 (252), pero distintos en relación a la cefotaxima (0,2-0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), ceftizoxima (0,06-0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) y ceftriaxona (0,1-0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), más compatibles con TEM-5, TEM-6, TEM-7, TEM-8, TEM-12 (252) o la última BIPEA de tipo SHV identificada, SHV-6, descrita por Arlet y cols. (17). La reacción positiva en la hibridación en colonia con sondas específicas de la familia SHV y ausencia de hibridación con otra de la familia TEM, objetivó que nos encontrábamos ante una BIPEA de tipo SHV. Además, el perfil de sustrato o inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín fue distinto del de SHV-2 (434), pero superponible al que obtuvimos con la enzima patrón SHV-6 de igual pI que la BIPEA SHV-2 (FIGURAS 15 y 16).

Con anterioridad a la caracterización de la enzima SHV-6, Shannon y cols. (526) describieron una cepa de *K. pneumoniae* con una  $\beta$ -lactamasa de pI 7,6 que confería idéntico nivel de resistencia. En ambos casos se obtuvieron unos perfiles de sustrato muy similares a los de la

enzima SHV-1, particularmente en lo referente a la baja tasa de hidrólisis de la ceftazidima. Esta característica no es exclusiva de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 ya que algunas enzimas derivadas de ella, SHV-2 y SHV-3, también presentan esta particularidad (437).

Recientemente, **Petit y cols.** (447) han confirmado que la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 en *K. pneumoniae* y *E. coli* eleva los valores de CMI para la ceftazidima (8-16  $\mu\text{g/ml}$ ) y el aztreonam (2-8  $\mu\text{g/ml}$ ) sin modificar los de la cefotaxima (0,03  $\mu\text{g/ml}$ ). Este fenotipo es similar al observado con la  $\beta$ lPEA SHV-6 descrita por **Arlet y cols.** (17), la enzima encontrada por **Shannon y cols.** (526) y el descrito en nuestras cepas. Sin embargo, los estudios de sensibilidad demostraron la menor actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa en cepas hiperproductoras de SHV-1 (447) respecto de las cepas de *K. pneumoniae* con la enzima SHV-6 descrita por **Arlet y cols.** (17) y la encontrada por **Shannon y cols.** (526). En nuestro estudio confirmamos la efectividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas tanto en cepas con la  $\beta$ -lactamasa prototipo SHV-6 (datos no mostrados) como en las cepas clínicas con la  $\beta$ lPEA de pI 7,6 de fenotipo SHV-6 (TABLA 39). Asimismo, el porcentaje de inhibición máximo y la pendiente de inhibición para los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas en el análisis de la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefin, fueron superponibles a los del enzima SHV-6, siendo inferiores a los obtenidos con la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 (FIGURA 16). Este hecho y los resultados con esta técnica para otros antibióticos como la cefotaxima facilitarían la diferenciación entre la enzima SHV-6, SHV-1 y su estado hiperproducido. Con independencia de esta observación, serían necesarios estudios de secuenciación que determinasen la complementariedad de la  $\beta$ -lactamasa de estas cepas y la de la enzima SHV-6 e identificasen las mutaciones responsables de su fenotipo de resistencia. Las sustituciones en los residuos 102 y 162, no descritas para la  $\beta$ lPEA de tipo SHV (TABLA 3), elevan los valores de CMI para la ceftazidima (111,547), por lo que esta nueva  $\beta$ -lactamasa podría poseer alguna de estas dos modificaciones.

Aparte de los datos referidos en el presente trabajo, en España no se ha identificado con anterioridad esta nueva enzima, SHV-6, aunque han sido previamente caracterizadas las enzimas SHV-2 (3,106,165,167,496), SHV-4 (165) y SHV-5 (**Cantón, Liñares, Martínez-Beltrán**, datos no publicados). Debemos consignar que en las heces de un paciente, incluido en el estudio epidemiológico de los portadores fecales de *Enterobacteriaceae* con  $\beta$ lPEA, identificamos una cepa de *C. freundii* con una enzima de pI 7,6, presumiblemente SHV-2, y en las heces de otro una cepa de *K. pneumoniae* y otra de *E. coli* con una  $\beta$ -lactamasa de pI 8,0. El estudio de sensibilidad de estas últimas mostró un perfil típico de la codificación de una  $\beta$ lPEA: resistencia a la ceftazidima (2-4  $\mu\text{g/ml}$ ), aztreonam (4-8  $\mu\text{g/ml}$ ) y cefotaxima (32-64  $\mu\text{g/ml}$ ) y sensibilidad a la cefoxitina (1-2  $\mu\text{g/ml}$ ) e imipenem (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ). La sinergia en la prueba de doble difusión con disco fue positiva tanto en las cepas originales como en sus respectivos transconjugantes. Hasta la fecha no existen

BIPEA descritas con un pI de 8,0, siendo SHV-4 de pI 7,75 (19), SHV-5 de pI 8,2 (205) y FEC-1 de pI 8,2 (355) las más cercanas. Otras enzimas plasmídicas con un valor de pI 8,1, son ROB-1 (366) y CEP-2 (292); ambas se inhiben por el ácido clavulánico, pero, a diferencia de las anteriores, no confieren resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación. El valor alcalino del pI de nuestra BIPEA - 8,0 - y el particular fenotipo de resistencia que determina, valores de CMI para la cefotaxima de 8 a 32 veces más elevados que los de la ceftazidima y el aztreonam, indicarían la existencia de una BIPEA no descrita con anterioridad.

El segundo grupo de BIPEA identificadas en nuestro Hospital presentó un pI de 5,9, diferenciándose claramente 2 subgrupos al analizar el fenotipo de resistencia que confieren. Hasta el momento se han descrito 5 BIPEA diferentes derivadas de TEM con un pI de 5,9-6,0: TEM-4, -6, -8(CAZ-2), -15 y -17 (42,130,322,324,437). En todas ellas se produce una substitución del glutámico de la posición 102 de TEM-1 por la lisina, determinando, con la excepción de TEM-17 (68), un elevado valor de CMI para la ceftazidima (32-128 µg/ml). Por el contrario, la CMI de la cefotaxima solo se muestra elevada con la enzima TEM-4 y TEM-15 (65,437).

En nuestro estudio, los aislamientos relacionados con el Servicio de Pediatría, 7 cepas de *E. coli* y sus respectivos transconjugantes, poseían un valor de CMI para la ceftazidima muy similar al de la cefotaxima (4-8 µg/ml) (TABLA 40). El perfil de inhibición competitivo de la hidrólisis del nitrocefín fue superponible al obtenido con la BIPEA TEM-4 (FIGURAS 21 y 22) y similar al observado por Papanicolaou y Medeiros (434) para esta enzima. Las cepas identificadas en la Unidad de Cardiología Pediátrica con pI 5,9, que se correspondían con la epidemia por *S. arizonae* y las encontradas en un enfermo seguido por la Unidad de Fibrosis Quística, se caracterizaban por unos valores de CMI inusualmente elevados para la ceftazidima (16-1024 µg/ml) con respecto a los obtenidos para la cefotaxima, ceftizoxima y ceftriaxona (0,5-8 µg/ml) (TABLA 40), estando en relación con los descritos para la BIPEA TEM-6 (42). Sin embargo, el perfil de inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín fue diferente por sus valores de inhibición máxima de la cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina y el cefotetan del obtenido con la enzima TEM-6, distanciándose en menor medida de la β-lactamasa TEM-8 (FIGURA 20). Las cepas con la BIPEA de pI 5,9 hibridaron con la sonda específica de la familia TEM, denominándose por sus características fenotípicas y bioquímicas, de forma preliminar, como TEM-6/8.

Entre las cepas de *S. arizonae* de la Unidad de Cardiología Pediátrica destacó la presencia de un aislamiento con un mayor nivel de resistencia a la ceftazidima (1024 µg/ml) y otros antibióticos β-lactámicos. Goussard y cols. (197) en el estudio genético del gen *bla*<sub>TEM-6</sub> que codifica la enzima TEM-6 demostraron que la presencia de un elemento de inserción, al que



denominaron "IS1-like", elevaba el nivel de resistencia conferido por esta enzima. Este fragmento no es exclusivo de esta  $\beta$ -lactamasa, habiéndose identificado en un 47% de las cepas de *Enterobacteriaceae* con enzimas de tipo TEM, por lo que la participación de este tipo de secuencias en esta cepa podría ser el determinante del incremento de los valores de CMI.

Por otra parte, todas las cepas de *S. arizonae* procedentes de la epidemia de Cardiología Pediátrica presentaron igual perfil bioquímico y serológico, evidenciando en el estudio epidemiológico un posible origen común (FIGURA 30). La resistencia a  $\beta$ -lactámicos, al igual que lo descrito para otras enzimas, estaba unida a la de gentamicina y tobramicina pero no a la de ampicilina, caracterizándose la enzima AAC(3)V<sup>GL</sup>. La codificación por un plásmido relativamente pequeño (59 Kb) fácilmente transferible (frecuencia de conjugación  $2 \times 10^{-8}$ - $4 \times 10^{-5}$ ), la resistencia a aminoglicósidos y la presión selectiva del consumo de antibióticos en esta área concreta hicieron posible, verosimilmente, su rápida dispersión. Medidas de control epidemiológico, vigilancia extrema de la diseminación de estos aislamientos y cambio de actitud en la terapia administrada evitaron su difusión a más de los 9 pacientes en los que se localizó.

Es de resaltar que sin ningún nexo epidemiológico demostrable, se aisló en un esputo de un paciente ambulatorio seguido por la unidad de Fibrosis Quística una cepa de *S. arizonae* y otra de *E. coli* con un perfil de sensibilidad similar al de las cepas aisladas en la Unidad de Cardiología Pediátrica. La  $\beta$ -lactamasa responsable presentó idénticas características (TEM-6/8) y en ambos casos se constató la cotransferencia de la resistencia a la ceftazidima con la resistencia a gentamicina y tobramicina pero no a ampicilina [AAC(3)V<sup>GL</sup>]. La aparición de una BIPEA en un lugar distinto y distante del inicial de aislamiento es un hecho relativamente frecuente que incluso se ha constatado en continentes diferentes del inicial (44,205,249). La identificación de una BIPEA inusual, TEM-6/8, en un patógeno poco frecuente, *S. arizonae*, elevaría la importancia del hallazgo.

En el género *Salmonella* se han caracterizado, hasta la fecha, 3 tipos diferentes de BIPEA: TEM-3 (CTX-1), CTX-2 y SHV-2 (16,51,52,98,214,291,322,451,467,490). Estas enzimas se han identificado en varias especies o serovariedades sin que existan referencias previas que las publicadas por nuestro grupo que relacionen *S. arizonae* con las BIPEA (348). Algunas especies de *Salmonella*, como *S. wien* (214,215,451), se han asociado a epidemias en unidades de neonatología u otras, como *S. mbandaka* (467), se han aislado en pacientes pediátricos. Asimismo, en España Roy y cols. (490) han comunicado una epidemia por *Salmonella* spp. con resistencia transferible a cefalosporinas de 3ª generación que afectó a 7 pacientes pediátricos de una misma unidad.

Con la excepción de un solo trabajo que refiere la identificación de una cepa de *E. coli* con la enzima TEM-4, no existen otros estudios en España que evidencien el aislamiento de cepas clínicas con  $\beta$ lactamasa de pI 5,9 (165). Tan solo se han caracterizado, dentro de las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM, dos enzimas de pI 5,5 - TEM-9 (165) y TEM-10 (3) -, una de pI 6,3 relacionada con TEM-3 (167) y otras enzimas que confieren mayor resistencia a ceftazidima que a cefotaxima con un pI de 5,3-5,4 (495,496). Es de resaltar que en la búsqueda epidemiológica de portadores fecales de *Enterobacteriaceae* con  $\beta$ lactamasa se identificaron 4 cepas de *E. coli*, procedentes de 3 pacientes, con una enzima de pI 5,9. En tres de los aislamientos, la  $\beta$ -lactamasa se acompañaba, al igual que la enzima TEM-6/8, de la enzima modificante de aminoglicósidos AAC(3)V<sup>GL</sup> que confiere resistencia a la gentamicina y tobramicina (189), pudiendo indicar un mismo origen clonal. Sin embargo, los valores de sensibilidad a cefotaxima son algo más elevados, acercándose a los encontrados en los aislamientos con TEM-4.

Payne y cols. (438,442,443) y Sougakoff y cols. (548) describieron la selección "in vitro" de cepas con  $\beta$ lactamasa a partir de aislamientos con TEM-1 y TEM-2 en presencia de ceftazidima, con características similares a otras enzimas aisladas de muestras clínicas (TEM-E1,-E2,-E4,-7, CAZ-lo y CAZ-hi) (252,438). La frecuencia de mutación era inferior a  $10^{-7}$  y el rango de pI oscilaba entre 5,3 y 6,5 con una mayor distribución en torno a 5,4, siendo los valores de CMI para la ceftazidima (4-32  $\mu$ g/ml) superiores a los de la cefotaxima (0,06-0,5  $\mu$ g/ml). Con igual fenotipo de resistencia identificamos en nuestro hospital un tercer grupo de  $\beta$ lactamasa con un pI 5,4 (TABLA 43) en 6 cepas de *E. coli*, procedentes de 3 pacientes distintos que habían recibido previamente antibióticos  $\beta$ -lactámicos (TABLA 50). El perfil de resistencia de las 6 cepas de *E. coli* con la  $\beta$ -lactamasa de pI 5,4 y de sus respectivos transconjugantes (TABLA 43) tiene ciertas similitudes con el observado en aislamientos de *E. coli* que presentan hiperproducción de su  $\beta$ -lactamasa cromosómica: disminución de la actividad de metoxi- $\beta$ -lactámicos y elevación selectiva de los valores de CMI de ceftazidima, conservando una mejor actividad la cefotaxima y la ceftiproma (296,349,565). Asimismo, la menor actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa, observada con la técnica de la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín, acercaría esta enzima a las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas. Por el contrario, el valor de su pI, 5,4, está alejado de los encontrados habitualmente en *E. coli* para las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, 7,4-8,8 (351), aunque recientemente se ha descrito una  $\beta$ -lactamasa cromosómica de la clase A en *P. aeruginosa* con un pI de 5,4 (414).

En España Roy y cols. (495,496) han descrito cepas productoras de ceftazidimasas con pI 5,3-5,4 que hibridan con sondas de tipo TEM pero no muestran semejanza con TEM-1 (pI 5,4) por técnicas combinadas de isoelectroenfoque y electroforesis. Estas  $\beta$ -lactamasas son muy similares a la encontrada por nosotros que por su pI podría tratarse de la enzima TEM-1. No obstante, a

diferencia de ella, el fenotipo que determina incluye resistencia o sensibilidad disminuida a la ceftazidima y la cefotaxima y cierta pérdida de actividad de las asociaciones de penicilinas e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, si bien estos últimos demuestran sinergia con las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación (TABLA 45). Los datos obtenidos por la técnica de la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín son diferentes de los observado con otras enzimas de pI 5,4: TEM-1, TEM-7, TEM-Ha1 e IRT-3 (FIGURAS 25 y 26). Esta última enzima confiere resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa y al igual que TEM-E1,-7,-19, y TEM-20 (252,438) ha surgido a partir de modificaciones en la secuencia nucleotídica de TEM-1, mostrando igual pI que su predecesora (66). La hibridación en colonia con una sonda específica de la familia TEM indicaría que se trata de una nueva enzima relacionada con este grupo y el fenotipo que determina y perfil de sustrato la incluiría dentro de las BIPEA.

Con respecto a los resultados obtenidos con los inhibidores clásicos de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en las cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de BIPEA, el ácido clavulánico disminuyó de forma eficaz la CMI para cada antibiótico en mayor medida que el tazobactam y el sulbactam, lo que está en concordancia con los trabajos de Bush (94) y Labia y cols. (288). Estos autores demostraron la mayor afinidad de los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas por estas enzimas que por sus predecesoras. En nuestro estudio, con la excepción de la BIPEA de pI 5,4, los valores encontrados en el ensayo de la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín corroboran esta afirmación. La BIPEA de pI 5,4, se comportó frente al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam de forma muy similar a la descrita por Papanicolaou y Medeiros (434) para las enzimas TEM-5 de pI 5,57 y TEM-9 de pI 5,56, frente a las que disminuye la actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Asimismo, la presencia de una  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro, TEM-1, TEM-2 o SHV-1, en una cepa con una BIPEA ha sido previamente relacionada con la disminución de la actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (259,278). Con la excepción de 8 aislamientos de *K. pneumoniae* con una BIPEA SHV-2, que presentaron además una TEM-1 y que mostraron una CMI para cefotaxima de 64  $\mu$ g/ml superior a la del resto de las cepas con estas dos enzimas, no se observó la disminución de la actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

Por otra parte, el BRL 42715B, inhibidor de amplio espectro de estructura penémica con actividad tanto sobre  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas como cromosómicas de las clases I y IV (100,468), demostró una actividad comparable a la del ácido clavulánico y el tazobactam frente a las BIPEA SHV-2, SHV-6 y TEM-6/8, siendo el inhibidor menos activo frente a TEM-4. Por el contrario, fue más activo que el ácido clavulánico y el tazobactam frente a la BIPEA de pI 5,4, demostrando también buena actividad en aquellas cepas que presentaron además de la BIPEA una enzima de tipo cromosómico.

La coexistencia de dos  $\beta$ -lactamasas e incluso tres en una misma cepa no es un hecho nuevo ni infrecuente (322). TEM-1 es la enzima que se asocia de forma más frecuente a una  $\beta$ lPEA, pudiendo localizarse en el mismo plásmido que la codifica. En nuestra experiencia el 51,2% de las cepas presentaron más de una banda en el isoelectroenfoco, asociándose el 9,7% de éstas con una  $\beta$ -lactamasa cromosómica y un 90,2% con la TEM-1. Es de destacar que en un alto porcentaje de los casos (70,3%) la enzima TEM-1 cotransfirió con la correspondiente  $\beta$ lPEA, indicando con ello su posible presencia en el mismo plásmido. Además de los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, los plásmidos que codifican las  $\beta$ lPEA presentan habitualmente otros genes de resistencia (255,259,449,451,532,541). Al igual que en otros estudios (166,451), la resistencia a los aminoglicósidos (97,5%), las sulfamidas (80%) o las tetraciclinas (43,7%) fueron los marcadores identificados con mayor asiduidad junto a las  $\beta$ lPEA. En la mayoría de estos trabajos la resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación se asoció con la de amicacina y tobramicina sin afectar a la gentamicina, siendo responsable la enzima AAC(6')IV (16,19,127,259,406,449,532). En nuestra experiencia solamente un 14,1% de los aislamientos con resistencia a los aminoglicósidos, 4 cepas de *K. pneumoniae* con SHV-2 y 6 cepas de *E. coli* con TEM-4, mostraron unos valores de CMI para la amicacina superiores a 2  $\mu$ g/ml, identificándose en ellas la enzima AAC(3)V<sup>CG</sup>.

La enzima AAC(3)V<sup>GL</sup> que confiere resistencia a gentamicina y tobramicina pero no a amicacina (189) fue la enzima modificante de aminoglicósidos caracterizada con mayor frecuencia (58,9%), asociándose tanto a  $\beta$ lPEA de tipo SHV (SHV-2) como de tipo TEM (TEM-6/8). Las enzimas ANT(3'') (9) y APH(3''), responsables de la resistencia a estreptomicina (82), y APH(3')I, que confiere resistencia a kanamicina y neomicina (82), también se encontraron asociadas a las  $\beta$ lPEA en el 24,3%, 21,8% y 14,1%, respectivamente. Estos datos de incidencia de enzimas modificantes de aminoglicósidos son cercanos a los descritos por Dornbusch y cols. (147) y Culebras (119) para el conjunto de *Enterobacteriaceae* en nuestra área geográfica. El hallazgo de similares enzimas asociadas a las  $\beta$ lPEA en un hospital próximo al nuestro (167) sugeriría que la incidencia local de estas enzimas determinaría su asociación con las  $\beta$ lPEA.

Aunque no es un mecanismo de origen plasmídico, la resistencia a quinolonas se detectó en el 6,2% de las cepas, siendo inferior al de otras series que alcanzan incluso el 70% de los aislamientos (19,128,285). La introducción de un plásmido con el gen salvaje de la *gyrA* de *E. coli* K12 disminuyó el valor de las CMI de las quinolonas en tan solo una cepa de *K. pneumoniae* con una SHV-2 y solo parcialmente en una *S. marcescens* con una TEM-4. Este hecho indicaría, según lo establecido por Hane y Wood (217) y Nakamura y cols. (392), que la resistencia a quinolonas en la cepa de *K. pneumoniae* se debe a mutaciones de la subunidad *gyrA* y sólo parcialmente a ésta en la de *S. marcescens*. Es de resaltar la presencia de una cepa reiteradamente aislada en el mismo

paciente cuyo nivel de resistencia al ácido nalidíxico y fluorquinolonas no se vió afectada por la introducción del alelo salvaje *gyrA*. Por el contrario, en las 3 cepas con resistencia a quinolonas identificadas en el estudio de portadores fecales de *Enterobacteriaceae* con BIPEA se asoció siempre la resistencia a estos antibióticos con las mutaciones en *gyrA*.

El estudio realizado sobre BIPEA en nuestro medio ha permitido captar las primeras fases evolutivas de este nuevo y amenazante capítulo de las resistencias bacterianas. En sólo pocos años, una importante diversidad de enzimas de esta naturaleza ha aparecido en bacterias aisladas de infecciones clínicas, y, verosímilmente, empiezan a distribuirse en los microorganismos integrantes de la flora normal. Una limitación a su expansión endémica podría estar constituida por la barrera que ofrecen las enterobacterias ya resistentes a otros antibióticos, constantemente seleccionadas por terapéuticas de amplia utilización extrahospitalaria. Además, la incompatibilidad plasmídica reduciría a un número relativamente pequeño de vectores las posibilidades de diseminación interbacteriana de las BIPEA. Sin embargo, el uso incrementado de nuevas cefalosporinas - particularmente si se desarrollan cefalosporinas orales de la 3ª generación - podrían cambiar este escenario a corto o medio plazo. La labor del microbiólogo clínico debe incluir la realización de predicciones evolutivas de los mecanismos de resistencia. Para ello, es esencial la promoción de tres estrategias: 1) implementar la capacidad de detección de la resistencia por procedimientos fenotípicos o genéticos sencillos y asequibles; 2) realizar estudios de incidencia y evolución de las cepas resistentes; y 3) proporcionar datos para el establecimiento de políticas eficaces de uso de antimicrobianos. El desarrollo de este trabajo se ha dirigido a cumplimentar este deber de la Microbiología Clínica.

## **VI.- CONCLUSIONES**

---

El análisis de la evolución de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en 24.058 aislamientos de *Enterobacteriaceae*, obtenidos entre 1987 y 1992, nos ha permitido establecer un sistema de detección fenotípica de los mecanismos de resistencia basado en criterios interpretativos, con las siguientes conclusiones fundamentales:

- 1.- En *E. coli* se detecta una disminución en la incidencia del fenotipo debido a la producción normal de  $\beta$ -lactamasa plasmídica y por tanto de la resistencia a la ampicilina. No obstante, se produce un aumento significativo del fenotipo mediado por hiperproducción y del número de aislamientos inhibidos por concentraciones críticas intermedias (resistencia de bajo nivel). Asimismo, en el 0,2% de las cepas se detecta un fenotipo característico de BIPEA.
- 2.- En *Salmonella spp.* se detecta un incremento significativo de la resistencia a la ampicilina con una tasa final del 25%, asociado a un fenotipo determinado por  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas, y se caracteriza un fenotipo mediado por BIPEA ligado a una epidemia intrahospitalaria por *S. arizonae*.
- 3.- En *P. mirabilis* y *P. vulgaris* no se observan cambios sustanciales de comportamiento en cuanto a la incidencia de la resistencia, no habiéndose detectado cepas con BIPEA.
- 4.- En *K. pneumoniae* la incidencia del fenotipo debido a la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa cromosómica constitutiva es significativamente menor que en *K. oxytoca* (4,9% vs. 35,6%). Por el contrario, en el 1,6% de las cepas de *K. pneumoniae* se caracteriza un fenotipo mediado por BIPEA no encontrado en *K. oxytoca*.
- 5.- En *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morganii* y *S. marcescens* el fenotipo más frecuente se asocia a la producción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles. La incidencia de aislamientos con resistencia a cefalosporinas de 3ª generación debida a la hiperproducción de estas enzimas fue más frecuente en *E. aerogenes* ( $\bar{x}$ =43,3%) que en *C. freundii* (26,1%); *S. marcescens* (22,5%), *E. cloacae* (21,9%) y *M. morganii* (18,4%). Esta tasa de resistencia se estabiliza tras unos años de incremento, probablemente debido al descenso en el consumo de cefalosporinas de 3ª generación. Por otra parte, en *Enterobacter* y *Serratia* se caracteriza un fenotipo mediado por BIPEA.

El estudio del fenotipo determinado por *BIPEA* en *Enterobacteriaceae* permite extraer las siguientes conclusiones:

- 6.- La incidencia media de *Enterobacteriaceae* con *BIPEA* entre 1987 y 1992 fue del 0,3%. La caracterización de la enzima SHV-2 en 3 aislamientos de *E. coli*, en junio de 1988, supone la primera constatación de este mecanismo de resistencia en España. En 1989 se describe por vez primera en nuestro país una epidemia intrahospitalaria por *Enterobacteriaceae* (*S. arizonae*) productoras de *BIPEA*, TEM-6/8, y se caracteriza la enzima SHV-6. Asimismo, la identificación de SHV-2 en una cepa de *E. gergoviae* constituye el primer hallazgo de una *BIPEA* en esta especie.
- 7.- El reducido número de pacientes implicados, 44, denota una repercusión clínica poco relevante, aunque en el 82,5% existían criterios de infección. El 75,0% de los pacientes estaba relacionado con Servicios Quirúrgicos o Unidades de Cuidados Intensivos; no obstante, el 9,1% procedía del ámbito extrahospitalario. El tratamiento previo con cefalosporinas de 3ª generación (82,5%) o en asociación con un aminoglicósido (42,4%) y la prolongada estancia hospitalaria prevalecen como factores epidemiológicos asociados.
- 8.- El estudio de portadores fecales de *Enterobacteriaceae* con *BIPEA* reveló una incidencia del 0,5%, aislándose exclusivamente en pacientes ingresados o que recientemente habían permanecido en el hospital. En este grupo se han detectado tres tipos de *BIPEA*: SHV-2, TEM-4 y una tercera que por su elevado pI -8,0- y particular fenotipo de resistencia sugeriría la existencia de una *BIPEA* no descrita con anterioridad.
- 9.- El análisis de la resistencia inferida por 12 prototipos de *BIPEA* en una cepa de *E. coli* K12 permitió definir grupos fenotípicos en función del nivel de la resistencia a la ceftazidima, aztreonam y cefotaxima. Este agrupamiento sólo es posible cuando en el estudio de sensibilidad se utiliza un amplio rango de concentraciones.
- 10.- En *Enterobacteriaceae* de origen clínico se han identificado tres grupos de *BIPEA*: de pI 7,6: SHV-2 y SHV-6; de pI 5,9: TEM-4 y TEM-6/8; y de pI 5,4. La aplicación de los criterios del NCCLS calificó erróneamente como sensible el 55% de las cepas para cefotaxima y el 30% para ceftazidima. La consideración de puntos de corte más restrictivos (1-2 µg/ml) redujo este porcentaje al 5% y 2,5%, respectivamente.



- 11.- SHV-2 fue la BIPEA más frecuente respecto al número de cepas (43,7%) y pacientes en los que se aisló (56,8%). En *K. pneumoniae* evidenció una gran variación en su expresión, demostrándose una relación lineal entre los valores de CMI para cefotaxima y ceftazidima y la actividad enzimática específica. Esta observación, constatada para las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro, no ha sido previamente documentada para las BIPEA.
- 12.- SHV-6 se identificó en 2 cepas de *E. coli* y 1 de *K. pneumoniae*. El patrón de resistencia y los resultados de la técnica de inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín la individualizó de las  $\beta$ -lactamasas SHV-1 y SHV-2 de igual pl.
- 13.- TEM-6/8 se identificó en 24 cepas de *S. arizonae*, 1 de *E. coli* y 1 de *E. cloacae* en un brote epidémico en 9 pacientes de la Unidad de Cardiología Pediátrica y en 1 cepa de *S. arizonae* y otra de *E. coli* aisladas en un paciente de la Unidad de Fibrosis Quística. Esta enzima se caracterizó por un perfil de resistencia compatible con TEM-6 y una inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín próxima a TEM-8. La identificación de una enzima inusual, TEM-6/8, en un patógeno poco frecuente, *S. arizonae*, y la ausencia de referencias previas eleva la importancia de este hallazgo.
- 14.- La BIPEA de pl 5,4 se identificó en 6 cepas de *E. coli* de 3 pacientes no relacionados. Esta enzima, de pl coincidente con TEM-1, mostró un perfil de resistencia similar al conferido por la hiperproducción de AmpC en *E. coli* e inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín próxima a las enzimas IRT, por lo que podría tratarse de una nueva BIPEA.
- 15.- En las cepas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA se observó un efecto sinérgico entre las cefalosporinas de 3ª generación o el aztreonam y los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, mayor para el ácido clavulánico que para el tazobactam y el sulbactam. El BRL 42715B mostró una actividad comparable a la del ácido clavulánico frente a SHV-2, SHV-6 y TEM-6/8, siendo el menos activo frente a TEM-4 y el más efectivo en las cepas con la BIPEA de pl 5,4.
- 16.- El 98,7% de las cepas clínicas de *Enterobacteriaceae* con BIPEA mostraron al menos un marcador asociado de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, principalmente aminoglicósidos (97,5%) y sulfamidas (80,0%). La enzima modificante de aminoglicósidos AAC(3)V<sup>GL</sup>, que confiere resistencia a la gentamicina y tobramicina, fue la más prevalente (58,9), mientras que la enzima AAC(3)V<sup>CG</sup>, que confiere además resistencia a la ampicilina, sólo se encontró en el 14,1% de los aislamientos. El empleo de estos antimicrobianos incidiría en la selección y diseminación de las cepas con BIPEA.

## **VII.- BIBLIOGRAFIA**

---

- 1.- Abraham EP, Chain EB. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940; **146**:837-845.
- 2.- Abraham EP, Waley SG.  $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus*. En: Hamilton-Miller JMT, Smith JT (eds). *Beta-lactamases*. Academic Press Inc., Londres 1979. pp. 311-338.
- 3.- Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Colom K, Gallego L, Morla A, Umarán A, Cisterna R. 3er estudio multicéntrico de la resistencia a cefotaxima: detección y caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado. *Rev Esp Quimioterap* 1992; **5**:301-306.
- 4.- Alonso R, Nicholson PS, Pitt TL. Rapid extraction of high purity chromosomal DNA from *Serratia marcescens*. *Lett App Microbiol* 1993; **16**:77-79.
- 5.- Alós JI, Blázquez J, Baquero F. A new plasmid mediated TEM-1 type  $\beta$ -lactamase resistant to clavulanic acid, sulbactam and tazobactam detected in a clinical *Escherichia coli* isolate. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 581, p. 207.
- 6.- Alós JI, Gómez-Garcés JL, García-Bermejo I, García-Gómez, González-Palacios, Padilla B. Prevalencia de susceptibilidad de *Escherichia coli* a quinolonas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacteriurias extrahospitalarias de Madrid. *Med Clin* 1993; **101**:87-90.
- 7.- Alós JI, González-Palacios R, Sánchez-Moreno MP, Calderón P. Alta frecuencia de elevada resistencia a ampicilina en *Salmonella spp. no typhi*. *Med Clin (Barcelona)* 1990; **95**:175-177.
- 8.- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980; **289**:321-331.
- 9.- Ambler RP, Scott GK. Partial aminoacid sequence of penicillinase coded by *Escherichia coli* plasmid R6K. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**:3732-3736.
- 10.- Amicosante G, Marinucci MC, Franceschini N, Tizzani B, Oliva B, Oratore A. Fractionation and characterization of two  $\beta$ -lactamases in *Citrobacter diversus* ULA-27 strain by chromatofocusing. *J Chromatogr* 1987; **403**:366-372.
- 11.- Amicosante G, Oratore A, Joris B, Galleni M, Frere, Van Beeumen J. Chromosome-encoded  $\beta$ -lactamases of *Citrobacter diversus*. Interaction with  $\beta$ -iodopenicillinate and labelling at the active site. *Biochem J* 1988; **254**:891-893.
- 12.- Amsterdam D. Highlights of the 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Antimicrob News* 1988; **5**:89-90.
- 13.- Amyes SGB. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases: relative clinical importance. En: DM Livermore (ed). *Beta-lactamases: Current Perspectives*. Theracom Ltd, The Hague, 1987, pp. 31-49.
- 14.- Arakawa Y, Ohta M, Kido M, Fujii Y, Komatsu T, Kato N. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded  $\beta$ -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM  $\beta$ -lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Letters* 1986; **207**:69-74.
- 15.- Arakawa Y, Ohta M, Kido M, Mori M, Ito H, Komatsu T, Fujii Y, Kato N. Chromosomal  $\beta$ -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**:63-70.

- 16.- Archambaud M, Gerbaud G, Labau E, Marty N, Courvalin P. Possible in vivo transfer of  $\beta$ -lactamase TEM-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Salmonella kedougou*. J Antimicrob Chemother 1991; 27:426-436.
- 17.- Arlet G, Rousseau M, Bengoufa M, Nicolas MH, Philippon A. Novel transferable extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (SHV-6) from *Klebsiella pneumoniae* conferring selective resistance to ceftazidime. FEMS Microbiol Lett 1991; 81:57-62.
- 18.- Arlet G, Rousseau M, Fournier G, Lagrange PH, Philippon A. Novel, plasmid-encoded, TEM-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* conferring higher resistance to aztreonam than to extended-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:2020-2023.
- 19.- Arlet G, Sanson-le Pors MJ, Rousseau M, Fournier G, Marie O, Schlemmer B, Philippon A. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4  $\beta$ -lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:797-803.
- 20.- Arthur A, Sherratt DM. Dissection of the transposition process: a transposon encoded site-specific recombination system. Mol Gen Genet 1979; 175:267-274.
- 21.- Aspiotis A, Cullmann W, Dick W, Stieglitz M. Inducible  $\beta$ -lactamases are principally responsible for the naturally occurring resistance towards  $\beta$ -lactam antibiotics in *Proteus vulgaris*. Chemotherapy 1986 32:236-246.
- 22.- Atkinson BA, Lorian V. Antimicrobial agent susceptibility patterns of bacteria in hospital from 1971 to 1982. J Clin Microbiol 1984; 20:791-796.
- 23.- Atkinson BA, MA, MT(ASCP), SM(AAM). Species incidence and trends of susceptibility to antibiotics in the United States and other countries: MIC and MBC. En: V Lorian (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. 2nd Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986. pp. 995-1162.
- 24.- Ayliffe GAC. Ampicillin inactivation and sensitivity of coliform bacilli. J Gen Microbiol 1963; 30:339.
- 25.- Bandoh K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N, Ueno K. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacterioides fragilis*. J Antibiot 1992; 45:542-547.
- 26.- Baquero F. Resistencia a las quinolonas. Rev Esp Quimioterp 1988; 1: 21-30.
- 27.- Baquero F, Bouanchaud D, Martínez-Pérez MC, Fernández C. Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for a low molecular weight antibiotics in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1978; 135: 342-347.
- 28.- Baquero F, Reguera JA, Ojeda M, Cantón R, JL Martínez, J. Martínez-Beltrán, M. Martínez-Ferrer. *Escherichia coli* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación codificadas por una  $\beta$ -lactamasa de tipo plasmídico: primer brote en España. Rev Esp Microbiol Clin 1988; 3: 581-582.
- 29.- Baquero F, Saldaña MA, Blázquez J, González-Palacios R, Aguiar JM, Martínez JL, Vicente MF, Rubio C, Gómez-Lus R. Bleomycin-kanamycin resistance as a marker of the presence of transposon Tn5 in clinical strains of *E. coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8:995-998.

- 30.- Barany F. The ligase chain reaction in a PCR world. PCR Meth Appl 1991; 1:5-16.
- 31.- Barthélemy M, Péduzzi J, Ben Yaghlane H, Labia R. Single amino acid substitution between SHV-1  $\beta$ -lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme. FEBS Lett. 1988; 231:217-220.
- 32.- Barthélemy M, Péduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid mediated extended-spectrum MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. Biochem Biophys Acta 1992; 1122:15-22.
- 33.- Barthélemy M, Péduzzi J, Labia R. Distinction entre les structures primaires des  $\beta$ -lactamases TEM-1 et TEM-2. Ann Inst Pasteur Microbiol 1985; 136A:311-321.
- 34.- Barthélemy M, Péduzzi J, Labia R. Complete aminoacid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2  $\beta$ -lactamase (SHV-1). Biochem J 1988; 251:73-79.
- 35.- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45:493-496.
- 36.- Bauernfeind A. Classification of  $\beta$ -lactamases. Rev Infect Dis 1986; 8(Suppl):S470-S481.
- 37.- Bauernfeind A. Perspectives of beta-lactamases inhibitors in therapy of infections caused by *Escherichia coli* or *Klebsiella* with plasmidic resistance to third generation cephalosporins. Infection. 1990; 18:48-52.
- 38.- Bauernfeind A. Cefitibuten and bacterial kinetics. Comparative in vitro activity against *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. Diagn Microbiol Infect Dis 1991; 14:89-92.
- 39.- Bauernfeind A, Casellas JM, Wilhelm R, Schweighart S. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase in *Salmonella typhimurium*. 31st ICAAC 1991; Libro de resúmenes, resumen 942, p. 256.
- 40.- Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection 1989; 17:316-321.
- 41.- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection 1990; 18:294-298.
- 42.- Bauernfeind A, Hörl G. Novel R-factor borne  $\beta$ -lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. Infection. 1987; 15:257-259.
- 43.- Bauernfeind A, Mangold P, Schweighart S, Miller GH, Shaw KJ, Giamarellou H, Dornbusch K. Molecular analysis of a transferable cephamycinase in *Klebsiella pneumoniae*. 32nd ICAAC 1992; Libro de resúmenes, resumen 1268, p. 322.
- 44.- Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5  $\beta$ -lactamase among hospitalized patients. Infection 1993; 21:18-22.
- 45.- Bauernfeind A, Schweighart S, Dornbusch K, Giamarellou H. A transferable cephamycinase (CMY-ase) in *Klebsiella pneumoniae*. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 190, p. 118.

- 46.- Bauernfeind A, Wilhelm R, Holley M. Activity of the betalactamase inhibitor BRL 42715B against cephamycins. 31st ICAAC 1991. Libro de resúmenes, resumen 941, p. 256.
- 47.- Bejaoui N, Levesque RC. Structure-function analysis of critical aminoacids for extended-spectrum ceftazidimase in *Pseudomonas aeruginosa*. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 579, p. 207.
- 48.- Bellaouaj A, Lapoumeroulie C, Vedel G, Nénot P, Krishnamoorthy R, Paul G. Modifications structurales spontanées de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 entraînant la perte de la synergie entre les  $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. RICA 1991. Libro de resúmenes, resumen 25/C3.
- 49.- Bellaouaj A, Lapoumeroulie C, Vedel G, Nénot P, Krishnamoorthy R, Paul G. Aminoacid 241 of TEM-1 is highly critical in conferring resistance to ampicillin-clavulanic acid combination: molecular characterization of a natural mutant. 31th ICAAC 1991. Libro de resúmenes, resumen 944, p. 256.
- 50.- Bellido F, Vadianu IR, Auckenthaler R, Suter S, Wacker P, Then RL, Pechere JC. Permeability and penicillin-binding protein alterations in *Salmonella muenchen*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1113-1115.
- 51.- Ben Hassen A, Fournier G, Kechrid A, Fendri C, Ben Redjeb S, Philippon A. Résistance enzymatique au céfotaxime chez cinquante-six souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella spp.* dans un hôpital tunisien (1984-1988). Pathol Biol 1990; 38:464-469.
- 52.- Ben Redjeb S, Ben Yaghlane H, Boujnah A, Philippon A, Labia R. Synergy between clavulanic acid and newer  $\beta$ -lactams on 9 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* resistant to third generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1988; 21:263-266.
- 53.- Ben Redjeb S, Fournier G, Mabilat C, Ben Hassen A, Philippon A. Two novel transferable extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. FEMS Microbiol Lett 1990; 67:33-38.
- 54.- Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of  $\beta$ -lactamase induction in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:153-158.
- 55.- Bennett PM, Hawkey PM. The future contribution of transposition to antimicrobial resistance. J Hosp Infect 1991; 18(Suppl A):211-221.
- 56.- Berber M, Razwadowska-dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. Lancet 1948; 2:641-644.
- 57.- Bergstrom S, Lindberg FP, Olsson O, Normark S. Comparison of the overlapping *frd* and *ampC* operons of *Escherichia coli* with the corresponding DNA sequences in other gram-negative bacteria. J Bacteriol 1983; 155:1297-1305.
- 58.- Bergstrom S, Normark S.  $\beta$ -lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of *ampC*-mediated chromosomal  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16:427-433.

- 59.- Bergstrom S, Olsson O, Normark S. Common evolutionary of chromosomal  $\beta$ -lactamase genes in enterobacteria. *J Bacteriol* 1982; **150**:528-534.
- 60.- Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* 1992; **29**:590-592.
- 61.- Bernard H, Tancrede C, Sirot D, Morand A, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase with an unusually high isoelectric point. Kinetics of its interactions with 3rd generation cephalosporins. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 189, p. 118.
- 62.- Billot-Klein D, Gutmann L, Collatz E. Nucleotide sequence of the SHV-5  $\beta$ -lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:2439-2441.
- 63.- Bingen EH, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Mariani-Kurkdjian P, Lambert-Zechovsky NY, Debanmur E, Philippon A, Elion J. Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 1993; **31**:179-184.
- 64.- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; **7**:1513.
- 65.- Blázquez J, Baquero F. Posibilidades evolutivas de la resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM. XIV Congreso SEM, 1993. Libro de resúmenes, resumen SM-9-6-01, p. 61.
- 66.- Blázquez J, Baquero MR, Cantón R, Alós I, Baquero F. Characterization of a new TEM-type  $\beta$ -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam and tazobactam in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:2059-2063.
- 67.- Blázquez J, Gómez JM, González-Leiza M, Alós JI, Baquero MR, Baquero F. Highly fluoroquinolone resistance in clinical *Escherichia coli* strains: the involment of *gyrA* mutations. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 1549, p. 369.
- 68.- Blázquez J, Morosini MI, Negri C, Cantón R, Gonzalez-Leiza M, Baquero F. Beta-lactam susceptibility of a collection of TEM- $\beta$ -lactamase mutants obtained in the same *Escherichia coli* context. 33rd ICAAC. Libro de resúmenes, resumen 1513, p. 396.
- 69.- Bobrowski MM, Matthew M, Barth PT, Datta N, Grinter NJ, Jacob AE, Kontomichalou P, Dale JW, Smith JT. Plasmid-determined  $\beta$ -lactamase indistinguishable from the chromosomal  $\beta$ -lactamase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1976; **125**:149-157.
- 70.- Bolmstrom A, Arvidson S, Ericsson M, Karlsson A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. 28th ICAAC 1988. Libro de resúmenes, resumen 1209, p. 325.
- 71.- Bonomo RA, Currie-McCumber C, Shlaes D. OHIO-1  $\beta$ -lactamase resistant to mechanism-based inactivators. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **92**:79-82.
- 72.- Boyer HW, Roulland-Dussoix. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1966; **41**:459.

- 73.- Bradford PA, Sanders CC. The impact of  $\beta$ -lactamase in combination with a change in outer membrane protein (Omp) on susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics. 92nd ASM General Meeting. Libro de resúmenes, resumen A-142, p. 24.
- 74.- Branchman PS. Principles and methods. En: GL Mandell, RG Douglas, JE Bennett (ed). Principles and practice of infectious diseases. 3ª Edición. Churchill Livingstone, New York 1990, pp. 1658-1672.
- 75.- British Society for Antimicrobial Chemotherapy. A guide to sensitivity testing. J Antimicrob Chemother 1991; 27(Suppl D).
- 76.- Britz ML, Wilkinson RG. Purification and properties of  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13:373-382.
- 77.- Brown DFJ, Brown L. Evaluation of the E-Test: a novel method of quantifying antimicrobial activity. J Antimicrob Chemother 1991; 27:185-190.
- 78.- Brown DFJ, Farrington M, Warren RE. Imipenem resistant *Escherichia coli*. Lancet 1993; 342:177.
- 79.- Brun T, Ratovohery D, Gilly L, Vedel G, Névot P, Paul G. Clinical isolate of *Escherichia coli* producing a novel penicillinase conferring resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors. RICA 1992. Libro de resúmenes, resumen 327/P20, p. 242.
- 80.- Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet 1987; 2:302-306.
- 81.- Brun-Buisson C, Van Saene HFK. SDD and the novel extended-broad-spectrum  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother 1991; 28:145-146.
- 82.- Bryan LE. Aminoglycoside resistance. En: LE Bryan (ed). Antimicrobial Drug Resistance. Academic Press, Orlando 1984, pp. 242-277.
- 83.- Bryan LE. General mechanisms of resistance to antibiotics. J Antimicrob Chemother 1988; 22(Suppl A):1-15.
- 84.- Buurma RJA, Horrevorts AM, Wagenvoort JHT. Incidence of multi-resistant gram-negative isolates in eight dutch hospitals. Scand J Infect Dis 1991; 78(Suppl):34-44.
- 85.- Buré A, Legrand P, Arlet G, Jarlier V, Paul G, Philippon A. Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harboring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. Eur J Clin Microbiol 1988; 7:780-782.
- 86.- Burman LG. R-plasmid transfer and its response to nalidixic acid. J Bacteriol 1977; 131:76-81.
- 87.- Bush K. Recent developments in  $\beta$ -lactamase research and their implications for the future. Rev Infect Dis 1988; 10:681-690.
- 88.- Bush K. Characterization of  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:259-263.



- 89.- Bush K. Excitement in the  $\beta$ -lactamase arena. J Antimicrob Chemother 1989; 24:831-840.
- 90.- Bush K. Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:264-270.
- 91.- Bush K. Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:271-276.
- 92.- Bush K, Flamm RK, Ohringer S, Singer SB, Summerill R, Bonner DP. Effect of clavulanic acid on activity of  $\beta$ -lactam antibiotics in *Serratia marcescens* isolates producing both a TEM  $\beta$ -lactamase and a chromosomal cephalosporinase. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:2203-2208.
- 93.- Bush K, Freudemberger JS, Sykes RB. Interaction of azthreonam and related monobactams with  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22:414-420.
- 94.- Bush K, Singer SB. Biochemical characteristics of extended broad spectrum  $\beta$ -lactamases. Infection 1989; 17:429-433.
- 95.- Bush K, Sykes RB. Interactions of  $\beta$ -lactam antibiotics with  $\beta$ -lactamases as a cause for resistance. En: LE Bryan (ed), Antimicrobial Drug Resistance. Academic Press, New York. 1984, pp. 1-31.
- 96.- Bush K, Sykes RB. Methodology for the study of  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30:60-10.
- 97.- Bush K, Tanaka SK, Bonner DP, Sykes RB. Resistance caused by decreased penetration of  $\beta$ -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother, 1985; 27:555-560.
- 98.- Cabie A, Jouannelle J, Saintaime C. Bêta-lactamase à spectre élargi (CTX-1) chez *Salmonella panama* à Fort-de-France (Martinique). Med Mal Infect 1989; 19:418-420.
- 99.- Cantón R, Martínez-Beltrán R, Loza E, Martín-Palomeque P, Baquero F.  $\beta$ -lactam antibiotics activity against *Escherichia coli*  $OmpF^-$  harboring extended spectrum  $\beta$ -lactamases. 31st ICAAC 1991. Libro de resúmenes, resumen 113, p. 117.
- 100.- Cantón R, Martínez-Beltrán J, Loza E, Torrellas A, León A, Baquero F. BRL 42715B: Combined activity in  $\beta$ -lactamase inducible and derepressed gram-negative clinical strains. 5th ECCMID 1991. Libro de resúmenes, resumen 1382, p. 130.
- 101.- Cantón R, Martínez-Beltrán J, Pérez-Díaz JC, Blázquez J, Orden B, Baquero F. Resistance markers co-transferred in *Enterobacteriaceae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. 6th ECCMID 1993. Libro de resúmenes, resumen 474, p. 149.
- 102.- Cantón R, Negri MC, Morosini MI, Ródenas E, Almaraz F, Giner C, Martínez-Beltrán J. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro frente a *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* con diferentes mecanismos de resistencia. V Congreso SEIMC. Enf Infec Microbiol Clin 1992; 10 (Supl): 118 (resumen 346).
- 103.- Canut A, Brezmes MF, Antolín MI, García T, Conde ML, Prieto T. *Salmonella*: evolución de la resistencia a antimicrobianos en Zamora durante el período 1987-1991. V Congreso SEIMC 1992. Enf Infec Microbiol Clin 1992; 10 (Supl):116 (resumen 337).

- 104.- Casadaban M. Transposition and fusion of the *lac* genes to select promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Microbiol* 1976; **104**:541-555.
- 105.- Casellas J, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Argentina. *Infection* 1989; **17**:434-436.
- 106.- Cisterna R, Colom K, Alonso R. Estudio multicéntrico de la resistencia a cefotaxima mediante un estudio de prevalencia. *Rev Esp Quimioterap* 1990; **3**:181-186.
- 107.- Clewell DB, Helinsky DR. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc Natl Acad Sci* 1969; **62**:1159-1166.
- 108.- Coetsee JN, Datta N, Hedges RW. R factors from *P. rettgeri*. *J Gen Microbiol* 1972; **72**:543-552.
- 109.- Cole ST. Nucleotide sequence and comparative analysis of the *frd* operon encoding the fumarate reductase of *Proteus vulgaris*. Extensive sequence divergence of the membrane anchors and absence of an *frd*-linked *ampC* cephaloporinase gene. *Eur J Biochem* 1987; **167**:481-488.
- 110.- Collatz E, Gutmann L, Williamson R, Acar JF. Development of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics with special reference to third generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1984; **14**(Suppl B):13-21.
- 111.- Collatz E, Tran Van Nhieu G, Billot-Klein D, Williamson R, Gutmann L. Substitution of serine for arginine in position 162 of TEM-type  $\beta$ -lactamases extends the substrate profile of mutant enzymes, TEM-7 and TEM-101, to ceftazidime and aztreonam. *Gene* 1989; **78**:349-354.
- 112.- Cooksey R, Sweeney J, Clark N, Gay E, Thornsberry C. Patterns and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:739-745.
- 113.- Coombe RG, George AM. Purification and properties of an aminoglycoside acetyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 1982; **21**:871-875.
- 114.- Coovadia YM, Johnson AP, Bhana RH, Hutchinson GR, George RC, Hafferjee IE. Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J Hosp Infect* 1992; **22**:197-205.
- 115.- Corkill JE, Hart CA, Shears P. Plasmid mediated ceftazidime resistance associated with a  $\beta$ -lactamase giving a slow nitrocefin reaction. *J Antimicrob Chemother* 1989; **24**:467-470.
- 116.- Courvalin P. Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* 1992; **7**: 368-375.
- 117.- Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J (ed). *L'Antibiogramme*. MPC-Videom, Paris 1985.
- 118.- Cuchural G, Malmay MH, Tally FP.  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **30**:645-64.
- 119.- Culebras E. Resistencia a aminoglicósidos en *Staphylococcus spp.*. Estudios bioquímicos y genéticos. Tesis Doctoral. Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal. Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid. 1990.

- 120.- Cullmann W, Seibert G. Properties of an inducible  $\beta$ -lactamase from *Proteus vulgaris*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A) 1986; **262**:208-219.
- 121.- Curtis NAC, Brown C, Boxall M, Boulton MG. Modified peptidoglycan transpeptidase activity in a carbenicillin resistant mutant of *Pseudomonas aeruginosa* 18s. Antimicrobial Agents Chemother 1987; **14**:246-51.
- 122.- Curtis NAC, Eisenstadt RL, Rudd C, White AJ. Inducible type I  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1986; **17**:51-61.
- 123.- Chamberland S. Beta-lactamases: genetic control. En: LE Bryan (ed). Microbial Resistance to Drugs. Hand Book of experimental pharmacology v 91. Springer-Verlag, Berlin 1989, pp. 151-167.
- 124.- Champs de C, Guelon D, Joyon D, Sirot D, Chanal M, Sirot J. Treatment of a meningitis due to an *Enterobacter aerogenes* producing a derepressed cephalosporinase and a *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. Infection 1991; **19**:181-183.
- 125.- Champs de C, Henquell C, Guelon D, Sirot D, Gazuy N, Sirot J. Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to *Enterobacter aerogenes* resistant to imipenem. J Clin Microbiol 1993; **31**:123-127.
- 126.- Champs de C, Rouby D, Guelon D, Sirot J, Sirot D, Beytout D, Gourgands JM. A case control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3)  $\beta$ -lactamase. J Hospital Infection 1991; **18**:5-13.
- 127.- Champs de C, Sauvart MP, Chanal C, Sirot D, Gazuy N, Malhuret R, Baguet JC, Sirot J. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- $\beta$ -lactamases producing members of the family *Enterobacteriaceae* in a intensive care unit. J Clin Microbiol 1989; **27**:2887-2890.
- 128.- Champs de C, Sirot D, Chanal C, Poupart MC; Dumas MP, Sirot J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. J Antimicrob Chemother 1991; **27**:441-457.
- 129.- Chanal C, Poupart MC, Sirot D, Labia R, Sirot J, Cluzel R. Nucleotide sequences of CAZ-2, CAZ-6 and CAZ-7  $\beta$ -lactamase genes. Antimicrobial Agents Chemother 1992; **36**:1817-1820.
- 130.- Chanal CM, Sirot DL, Labia R, Petit A, Morand A, Sirot JL, Cluzel RA. Comparative study of a novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase, CAZ-2 and the CTX-1 and CAZ-1 enzymes conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1988; **32**:1660-1665.
- 131.- Chanal CM, Sirot DL, Petit A, Labia R, Morand A, Sirot JL, Cluzel RA. Multiplicity of TEM-derived  $\beta$ -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. Antimicrob Agents Chemother 1989; **33**:1915-1920.
- 132.- Chang ACY, Cohen SN. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J Bacteriol 1978; **134**:1141.
- 133.- Chapin-Robertson K, Edberg SC. Measurements of antibiotics in human body fluids. En: V Lorian (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, Baltimore 1991, pp. 295-366.

- 134.- Chardon H, Pachetti C, Collet L, Bellon O, Lagier E. Determination du point isoelectrique des betalactamases extraites de 69 souches de *Klebsiella oxytoca*. RICA 1992, Libro de réúmenes, resumen 330/P20, p. 244.
- 135.- Chen ST, Clowes RC. Variations between the nucleotide sequences of Tn1, Tn2, and Tn3 and expresión of  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. J Bacteriol 1987; 169:913-916.
- 136.- Cherubin CE. Antibiotic resistance of *Salmonella* in Europe and the United Estates. Rev Infect Dis 1981; 3:1105-1126.
- 137.- Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium choride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene 1979; 6:23-28.
- 138.- Dalbadie-McFarland G, Cohen LW, Riggs AD, Morin C, Itakura K, Richards JH. Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function. Proc Natl Acad Sci 1982; 79:6409-6413.
- 139.- Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factors in *Enterobacteriaceae*. Nature 1965; 208:239-241.
- 140.- Davies J, Brzezinska M, Benveniste R. The problems of drug-resistant pathogenic bacteria R-factors: Biochemical mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics. Ann NY Acad Sci 1971; 182:266.
- 141.- Delaire M, Labia R, Samama JP, Masson JM. Site-diret mutagenesis at the active site of *Escherichia coli* TEM-1  $\beta$ -lactamase. J Biol Chem 1992; 267:20600-20606.
- 142.- DeMarchi JM. The polymerase chain reaction. Clin Microbiol Newslet 1990; 12:81-84.
- 143.- Deschaseaux ML, Jouvenot M, Adessi GL, Michel-Briand Y. Two presumed novel  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 1988; 21:133-135.
- 144.- Dever LA, Dermody TS. Mecanismos of bacterial resistance to antibiotics. Arch Intern Med 1991; 151:886-895.
- 145.- Dodd HM, Bennett PM. R46 encodes a site-specific recombination system interchangeable with the resolution function of TnA. Plasmid 1983; 9:247-261.
- 146.- Dornbusch K, European Study Group on Antibiotic Resistance. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics and ciprofloxacin in gram-negative bacilli and staphylococci isolated from blood: a European collaborative study. J Antimicrob Chemother 1990; 26:269-278.
- 147.- Dornbusch KGH, Miller GH, Hare RS, Shaw KJ, ESGAR Study Group. Resistance to amynoglycoside antibiotics in gram-negative bacilli and staphylococci isolated from blood. Report from a European collaborative study. J Antimicrob Chemother 1990; 26:131-144.
- 148.- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high-voltage electroporation. Nucleid Acids Res 1988; 16:6127-6145.

- 149.- Drabu Y, Blakemore PH, Cox DM, McLaren A. Plasmid-mediated ceftazidime resistance. *J Antimicrob Chemother* 1989; **23**:287-290.
- 150.- Dyke KHG.  $\beta$ -lactamases of *Staphylococcus*. En: Hamilton-Miller JMT, Smith JT (ed). *Beta-lactamases*. Academic Press Inc 1979, Londres. pp. 291-310.
- 151.- Edlund T, Grundström T, Normark S. Isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal  $\beta$ -lactamase gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 1979; **173**:115-125.
- 152.- Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3ª Edición. Burgess Publishing Co., Mineapolis 1972.
- 153.- Eisenstein BI. *Enterobacteriaceae*. En: GL Mandell, RG Douglas, JE Bennett (Ed). Principles and practice of infectious diseases. 3ª Edición. Churchill Livingstone, New York 1990, pp. 1658-1672.
- 154.- Elliot TST, Shelton A, Greenwood D. The response of *Escherichia coli* to ciprofloxacin and norfloxacin. *J Med Microbiol* 1987; **23**:83-88.
- 155.- Emanuel EL, Gagnon J, Waley SG. Structural and kinetic studies on  $\beta$ -lactamase K1 from *Klebsiella aerogenes*. *Biochem J* 1986; **234**:343-347.
- 156.- Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand Sec B* 1971; **217**(Suppl):1-90.
- 157.- Espinasse F, Labia R, Nicolas MH. Treize souches de *Proteus mirabilis* dont sept épidémiques, résistantes au cefotaxime et au moins quatre types de  $\beta$ -lactamases à large spectre dont deux nouvelles. *RICAI* 1992. Libro de resúmenes, resumen 23/C3.
- 158.- Espinasse F, Mariotte S, Labia R, Nicolas MH. Each epidemic cefotaxime (CTX) resistant strain of *Proteus mirabilis* is related to an extended spectrum  $\beta$ -lactamase. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 1272. p. 323.
- 159.- Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4ª Edición. Elsevier Science Publishing Co. New York 1986.
- 160.- Fantin B, Pangon B, Potel G, Caron F, Vallée E, Vallois JM, Mohler J, Buré A, Philippon A, Carbon C. Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone in vitro and in experimental endocarditis caused by *Escherichia coli* producing SHV-2-like  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; **34**:581-586.
- 161.- Farhoudi-Moghaddam AA, Katouli A, Jafari A, Bahavar M, Parsi M, Malekzadeh F. Antimicrobial drug resistance and resistance transfer factor among clinical isolates of *Salmonella* in Iran. *Scan J Infect Dis* 1990; **22**:197-203.
- 162.- Farmer TH, Reading C. The effects of clavulanic acid and sulbactam on induction of Class I  $\beta$ -lactamase. *J Drug Dev* 1989; **2**(Suppl 1):47-50.
- 163.- Farrar WE Jr, O'Dell NM.  $\beta$ -lactamases and resistance to penicillins and cephalosporins in *Serratia marcescens*. *J Infect Dis* 1976; **134**:245-251.

- 164.- Fernández-Aranguiz A, Alonso A, Colom K, Gallego L, Garaizar J, Cisterna R. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica* aisladas en el hospital de Basurto (Bilbao) desde 1987 hasta 1990. *Enf Infec Microbiol Clin* 1992; 10:89-96.
- 165.- Fernández-Aranguiz A, Alonso R, Colom K, Gallego L, Morla A, Garaizar J, Cisterna R. Estudio multicéntrico de la resistencia a cefotaxima durante 1991: Detección y caracterización de nuevas  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado. *Rev Esp Quimioterp* 1991; 4:137-144.
- 166.- Fernández-Rodríguez A, Cantón R, Pérez-Díaz JC, Martínez-Beltrán J, Picazo JJ, Baquero F. Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2536-2538.
- 167.- Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, Picazo JJ, Baquero F. Primera epidemia española de resistencia plasmídica a cefalosporinas de tercera generación: implicación de SHV-2. *Enf Infec Microbiol Clin* 1992; 10:456-461.
- 168.- Ferraro MJ, Jacoby GA, Katsanis G, Solliday JT, Spargo J, Gayral JP. Improving the reliability of extended-spectrum beta-lactamase detection by the Vitek System. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 123. p. 131.
- 169.- Ferreira HMN, Sousa JC, Peixe LM. Characterization of the  $\beta$ -lactamasas responsible for the resistance of hospital strains of *Klebsiella pneumoniae* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Rev Port Doenc Infec* 1992; 15:207-209.
- 170.- Fiedler S, Wirth R. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Annal Biochem* 1988; 170:38.
- 171.- Finland M. Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. *Rev Inf Dis* 1979; 1:4-21.
- 172.- Fitzsimmons S, Gowen J, Solliday J, Gaytral JP. Characterization of  $\beta$ -lactamase production in the Vitek System. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 124. p. 131.
- 173.- Fleming A. On bacterial action of cultures of a penicillin with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929; 10:226-235.
- 174.- Flidel O, Leibovitz E, Juster A, Amitay M, Miskin A, Barak Y, Mogilner B. An out break of multiresistant *Klebsiella* in neonatal intensive care unit. 18th ICC 1993; Libro de resúmenes, resumen 163, p. 150.
- 175.- French G, Ling T. Amoxycillin/clavulanate resistant *Escherichia coli*. *Lancet* 1988 2:704.
- 176.- Fujii T, Sato K, Miyata K, Inoue M, Mitsuhashi S. Biochemical properties of  $\beta$ -lactamase produced by *Legionella gormanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:925-926.
- 177.- Fujii-Kuriyama Y, Yamamoto M, Sugawara S. Purification and properties of beta-lactamase from *Proteus morganii*. *J Bacteriol* 1977; 131:726-734.
- 178.- Fuster C, Roy C, Reig R, Raya C, Coria A. Frequency of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamasas in *Enterobacteriaceae* isolated in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:67-69.

- 179.- Galleni M, Lindberg F, Normark S, Cole S, Honore N, Joris B, Frere J-M. Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae* ampC  $\beta$ -lactamases genes and their products. *Biochem J* 1988; 250:753-760.
- 180.- Garbarg-Chenon A, Godard V, Labia R, Nicolas JC. Nucleotide sequence of SHV-2  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*.1990; 34:1444-1446.
- 181.- Garbarg-Chenon A, Vu Thien H, Labia R, Ben-Yaghlane H, Godard V, Deny P, Bricout F, Nicolas JC. Characterization of a plasmid coding for resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Salmonella typhimurium*. *Drugs Under Exper Clin Res* 1989; 15:145-150.
- 182.- Gerding DN, Peterson LR, Hughes CE, Bamberger DM, Larson TA. Extravascular antimicrobial distribution and the respective blood concentrations in humans. En: V Lorian (ed). *Antibiotics in Laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore 1991, pp. 880-961.
- 183.- Gerlach BA, Wiedemann B. Tn3 as the molecular basis of ampicillin resistance in *E. coli* - an epidemiological survey. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig Reihe A* 1985; 260:139-150.
- 184.- Giwercmann B, Hoyby N. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to beta-lactam antibiotics. *Infect Dis Newsl* 1991; 10:97-101.
- 185.- Goldstein FW, Gutmann L, Williamson R, Collatz E, Acar JF. In vivo and in vitro emergence of simultaneous resistance to both  $\beta$ -lactam and aminoglycoside antibiotics in a strain of *Serratia marcescens*. *Ann Microbiol (Paris)*, 1983; 134:329-337.
- 186.- Goldstein FW, Péan Y, Rosato A, Gertner J, Gutmann L, Vigil'Roc Study Group. Characterization of ceftriaxone-resistant *Enterobacteriaceae*: a multicentre study in 26 French hospitals. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32:595-603.
- 187.- Gómez A, Loza E, Martínez-Beltrán J, Baquero F. Género *Proteus*: Prevalencia y evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en un hospital general. *Rev Esp Quimioterap* 1991; 4:217-226.
- 188.- Gómez-Alfárez A, Baquero F, Cantón R, Loza E, Martínez-Beltrán J. The incidence and  $\beta$ -lactam resistance of *Proteus vulgaris* in hospital infections: the last decade. *J Chemother* 1991; 3:283-288.
- 189.- Gómez-Lus R, Rubio-Calvo MC, Larrad L, Navarro M, Lasierria M, Vitoria MA. 3-N-aminoglycoside-acetylating enzymes produced by R-plasmid-carrying bacteria isolated in a general hospital. En: JD Nelson, C Grassi (eds). *Current chemotherapy and infectious disease*. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1980 vol 1. pp. 708-710.
- 190.- González-Leiza M. Nueva  $\beta$ -lactamasa plasmídica de tipo AmpC en *Klebsiella pneumoniae*. Tesis Doctoral. Departamento de Biología molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. 1993.
- 191.- González-Leiza M, Casellas JM, Negri C, Morosini M, Cantón R, Martínez Beltrán J, Baquero F, Pérez-Díaz JC. Clavulanate-resistant plasmid-mediated *Klebsiella pneumoniae* determining resistance to cefoxitin and third generation cephalosporins. 5th ECCMID 1991. Libro de resúmenes, resumen 1777, p. 196.

- 192.- **González-Leiza M, Pérez-Díaz JC, Ayala J, Baquero F, Bush K.** Two molecular variants of a plasmid-mediated Class C cephalosporinase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. 33th ICAAC 1993. Libro de resúmenes, resumen 1519, p. 139.
- 193.- **González-Palacios R, Aguiar JM, Delgado A, de Rafael L, Loza E, Martínez-Beltrán J.** *Salmonella*: Incidencia de aislamiento y patrón de sensibilidad antimicrobiana. II Congreso SEIMC 1986. Libro de resúmenes, resumen 07/6, p. 90.
- 194.- **Gootz TD, Jackson DB, Sherris JC.** Development of resistance to cephalosporins in clinical strains of *Citrobacter spp.* Antimicrob Agents Chemother 1984; **25**:591-595.
- 195.- **Gootz TD, Sanders CC.** Characterization of  $\beta$ -lactamase induction in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 1983; **23**:91-97.
- 196.- **Gori A, Deplano A, Noohoff C, Serruys E, Moroni M, Struelens MJ.** Ceftazidim-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital: clonal diversity delimited by ADN pulse field electroforesis. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 639, p. 217.
- 197.- **Goussard S, Sougakoff W, Mabilat C, Bauerfeind A, Courvalin P.** An *Is1*-like element is responsible of high level synthesis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-6 in *Enterobacteriaceae*. J Gen Microbiol 1991; **137**:2681-2687.
- 198.- **Grace ME, Gregory FJ, Fu KP.** Purification and properties of a 22S-lactamase from *Proteus penneri*. J Antibiot (Tokyo) 1986; **39**:938-942.
- 199.- **Grundström T, Jaurin B.** Overlap between *ampC* and *frd* operons on the *Escherichia coli* chromosome. Proc Natl Acad Sci 1982; **79**:1111-1115.
- 200.- **Guerin S, Paradis F, Guay R.** Cloning and characterization of chromosomally encoded cephalosporinase gene of *Enterobacter cloacae*. Can J Microbiol 1985; **32**:301-309.
- 201.- **Guerry P, Leblanc DJ, Falkow S.** General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. J Bacteriol 1973; **116**:1064-1066.
- 202.- **Gur D, Pitt TL, Hall LM, Akalin HE, Livermore DM.** Diversity of *klebsiellae* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Turkish university hospital. J Hospital Infect 1992; **22**:163-167.
- 203.- **Gutmann L, Billot-Klein D, Williamson R, Goldstein FW, Mounier J, Acar JF, Collatz E.** Mutation of *Salmonella paratyphi A* conferring cross-resistance to several groups of antibiotics by decreased permeability and loss of invasiveness. Antimicrob Agents Chemother, 1988; **32**:195-201.
- 204.- **Gutmann L, Chabbert YA.** Different mechanisms of resistance to latamoxef (moxalactam) in *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother, 1984; **13**:15-22.
- 205.- **Gutmann L, Ferré B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, Collatz E.** SHV-5, a novel SHV-type  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. Antimicrob Agents Chemother 1989; **33**:951-956.



- 206.- Gutmann L, Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein F, Tran Van Nhieu G, Lu T, Carlet J, Collatz E, Williamson R. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:860-866.
- 207.- Gutmann L, Williamson R, Collatz E. The possible role of porins in bacterial antibiotic resistance. *Ann Inter Med*, 1984; **101**:554-557.
- 208.- Gutmann L, Williamson R, Moreau N, Kitzis MD, Collatz E, Acar JF, Goldstein FW. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J Infect Dis* 1985; **151**:501-507.
- 209.- Haas MJ, Dowding JE. Aminoglycoside-modifying enzymes. En: *Methods in enzymology*. Vol XLIII. Antibiotics. JH Hash (ed). Academic Press Inc, Londres 1975. p. 611-628.
- 210.- Hall A, Knowles JR. Directed selective pressure on a  $\beta$ -lactamase to analyses molecular changes involved in development of enzyme function. *Nature (london)* 1976; **264**:803.804.
- 211.- Hall LMC, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2)  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:1637-1644.
- 212.- Hall MN, Silhavy TJ. The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1981; **146**:23-43.
- 213.- Hamilton-Miller JMT, Smith JT (eds). *Beta-lactamases*. Academic Press Inc., Londres 1979.
- 214.- Hammani A, Arlet G, Ben Redjeb S, Grimont F, Ben Hassen A, Rekik A, Philippon A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella wien* producing SHV-2  $\beta$ -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; **10**:641-646.
- 215.- Hammani A, Ben Redjeb S, Fournier G, Ben Hassen A, Rekik A, Philippon A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis caused by multiple drug resistant *Salmonella wien* producing SHV-2  $\beta$ -lactamase in a neonate intensive care unit. 4th ECCMID 1989, Libro de resúmenes, resumen 884/PP43, p. 377.
- 216.- Hancock REW, Bell A. Antibiotic uptake into gram negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; **7**:713-720.
- 217.- Hane MW, Wood TH. *Escherichia coli* K12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. *J Bacteriol* 1969; **99**:238-241.
- 218.- Harder KJ, Nikaido H, Matshuhashi M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain  $\beta$ -lactam compounds lack the *ompF* porin. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **20**:549-552.
- 219.- Hart CA, Barr K, Makin T, Brown P, Cooke RWI. Characteristics of a  $\beta$ -lactamase produced by *Clostridium butyricum*. *J Antimicrob Chemother* 1982; **10**: 31-35.
- 220.- Hart CA, Percival A. Resistance to cephalosporins among gentamicin-resistant klebsiellae. *J Antimicrob Chemother* 1982; **9**:275-286.

- 221.- Healey WJ, Labgold MR, Richards JH. Substrate specificities in class A  $\beta$ -lactamases: preference for penams vs. cepheids. The role of residue 237. *Proteins* 1989; **6**:275-283.
- 222.- Hedges RW, Datta N, Kontomichalou P, Smith JT. Molecular species of R factor determined  $\beta$ -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J Bacteriol* 1974; **117**:56-62.
- 223.- Heffernan HM. Antibiotic resistance among *Salmonella* from human and other sources in New Zealand. *Epidemiol Infect* 1991; **106**:17-23.
- 224.- Hennessey TD, Richmond MH. The purification and some properties of a  $\beta$ -lactamase (cephalosporinase) synthesized by *Enterobacter cloacae*. *Biochem J* 1968; **109**:469-473.
- 225.- Henquell C, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Cluzel R. Frequency of TEM- $\beta$ -lactamases resistant to inhibitors (TRI) in *E. coli* strains isolated from urinary tract infections. 33rd ICAAC 1993. Libro de resúmenes, resumen 972, p. 297.
- 226.- Heritage J, Bennett PM. Plasmid fusions mediated by one end of TnA. *J Gen Microbiol* 1985; **131**: 1131-1140.
- 227.- Heritage J, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**:1981-1986.
- 228.- Herzberg O, Moulton J. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å resolution. *Science* 1987; **236**:694-701.
- 229.- Hirai K, Aoyama H, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **30**:248-253.
- 230.- Hirai K, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of a new  $\beta$ -lactamases from *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **17**:355-358.
- 231.- Hirai K, Sato K, Katsumata R, Inoue M, Mitsuhashi S. Immunological properties of  $\beta$ -lactamases that hydrolyze cefuroxime and cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **20**:262-264.
- 232.- Hiraoka M, Okamoto R, Inoue M, Mitsuhashi S. Effects of  $\beta$ -lactamases and *omp* mutations on susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**:382-386.
- 233.- Honore N, Nicolas NH, Cole ST. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J* 1986; **5**:3709-3714.
- 234.- Honore N, Nicolas NH, Cole ST. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of membrane bound sensory transducer. *Mol Microbiol* 1989; **3**:1121-1130.
- 235.- Hooper DC, Wolfson JS, Souza KS, Tung C, McHugh GL, Swartz NM. Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **29**: 639-644.

- 236.- Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N. Plasmid-mediated *ampC*-type  $\beta$ -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:984-990.
- 237.- Houssaye S, Goldstein F, Gutmann L, Kitzis MD, Acar JF. Role of the permeability barrier on the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors against bacteria containing new broad-spectrum  $\beta$ -lactamases. 29th ICAAC 1989; Libro de resúmenes, resumen 760, p. 760.
- 238.- Huletsky A, Couture F, Levesque RC. Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:1725-1732.
- 239.- Huletsky A, Knox JR, Levesque RC. Role of ser-238 and lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type  $\beta$ -lactamasas probed by site directed-mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem* 1993; **268**:3690-3687.
- 240.- Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. The sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:134-136.
- 241.- Huovinen S. Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase with Pharmacia PhastSystem. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:1730-1732.
- 242.- Huovinen S, Huovinen P, Jacoby GA. Detection of plasmid mediated  $\beta$ -lactamases with DNA-probes. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:175-179.
- 243.- Hupková M, Blahová J, Babalova M, Krcméry V, Schäfer V. Transferable resistance to imipenem in Hospital isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother* 1993; **5**:14-16.
- 244.- Idemyor V, Cherubin CE, Kuritza A. Spread of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in two Chicago hospitals. *Infect Dis News* 1992; **11**:68-70.
- 245.- Ikeda Y, Fukuoka Y, Motomura K, Yashuda T, Nishino T. Paradoxical effect of beta-lactam antibiotics against *Proteus vulgaris* in experimental infection in mice. *Antimicrob Agent Chemother* 1990; **34**:94-97.
- 246.- Ikeda Y, Nishino T. Paradoxical antibacterial activities of beta-lactams against *Proteus vulgaris*: mechanisms of paradoxical effect. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:1073-1077.
- 247.- Jack GW, Richmond MH. A comparative study of eight distinct betalactamases synthesized by gram negative bacteria. *J Gen Microbiol* 1970; **61**:43-61
- 248.- Jacobs MR, Aronoff SC, Jøhennig S, Shlaes DM, Yamabe S. Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR-830, clavulanate, and sulbactam combined with ampicillin and broad-spectrum penicillins against defined  $\beta$ -lactamase producing aerobic gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **29**:980-985.
- 249.- Jacoby GA. The expanding spectrum of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Table Ronde Roussel Uclaf n° 75. Institut scientifique roussel 1993, p. 23.
- 250.- Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Eng J Med* 1991; **324**:601-612.

- 251.- Jacoby GA, Carreras I. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:858-862.
- 252.- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**:1697-1704.
- 253.- Jacoby GA, Medeiros AA, O'Brien TF, Pinto ME, Jiang H. Broad-spectrum, transmissible  $\beta$ -lactamases. *N Engl J Med*. 1988; **319**:723-724.
- 254.- Jacoby GA, Sutton L. Beta-lactamases and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1985; **28**:703-705.
- 255.- Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**:164-169.
- 256.- Jaffe A, Chabert YA, Semonin O. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of  $\beta$ -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; **22**:942-948.
- 257.- Jalakas-Pornull K, Dornbusch K, Kuhn I, Ransjo U, Jonsson C, Broberger U. Characterization of  $\beta$ -lactam-resistant *K. oxytoca* isolated in a neonatal intensive care unit. *APMIS* 1991; **99**:530-536.
- 258.- Jarlier V, Bismuth R, Nicolas MH, Nguyen J, Truffot C, Grosset J. Survey of the phenotypes of susceptibility to  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* at the Pitie-Salpetriere Hospital. *J Antimicrob Chemother* 1984; **14**(Suppl B):59-64.
- 259.- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended spectrum-  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:867-878.
- 260.- Jaurin B, Grundström T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**:4897-4901.
- 261.- Jaurin B, Grundström T, Edlund T, Normark S. The *Escherichia coli*  $\beta$ -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 1981; **290**:221-225.
- 262.- Jenkins SG. Approaches to antibiograms and formulary-based antibiotic reporting. *Clin Microbiol Newsletter* 1990; **12**:30-32.
- 263.- Jiang H, Hopkins JD, Zieg J, Medeiros A, O'Brien TF. Origin and transposition of a gene encoding a TEM 12  $\beta$ -lactamase on pBWH102 and pBWH501 in ceftazidime resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* at one U.S. medical center. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 186. p. 117.
- 264.- Jonhson AP, Weinbren MJ, Ayling-Smith B, Du Bois SK, Amyes SGB, George RC. Outbreak of infection in two hospitals caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime and ceftazidime. *J Hospital Infect* 1992; **20**:97-103.
- 265.- Joris B, DeMeester F, Galleni M, Freere JM, VanBeeumen J. The K1  $\beta$ -lactamase of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem J* 1987; **243**:561-567.

- 266.- Joris B, DeMeester F, Galleni M, Masson S, Dusart S, Frerus JM, Van Beeumen J, Bush K, Sykes R. Properties of a class C  $\beta$ -lactamase from *Serratia marcescens*. *Biochem J* 1986; 239:581-586.
- 267.- Joris B, Ghuysen JM, Dive G, Renard A, Dideberg O, Charlier P, Frere JM, Kelly, Boyington JC, Moews PC, Knox JR. The active-site-serine penicillin recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R6K DD-peptidase family. *Biochem J* 1988; 250:313-324.
- 268.- Jouvenot M, Deschaseaux ML, Royez M, Mougin C, Cooksey R, Michel-Briand C, Adessi GL. Molecular hybridization versus isoelectric focusing to determine TEM- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:300-305.
- 269.- Kabins SA, Sweeney HM, Cohen S. Resistance to cephalotin in vivo associated with increased cephalosporinase production. *Ann Intern Med* 1966; 65:1271-1277.
- 270.- Katsanis G, Jacoby G. The frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:345-353.
- 271.- Katsu K, Inoue M, Mitsuhashi S. Plasmid-mediated carbenicillin hydrolyzing  $\beta$ -lactamases of *Proteus mirabilis*. *J Antibiot* 43:1504-1506.
- 272.- Kauffmann F. *Zentralbl Bakteriologie I Orig* 1930: 119-152.
- 273.- Kauffmann F. *Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe*. Copenhagen: Munksgaard. 1941.
- 274.- Kauffmann F. *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1966.
- 275.- Kauffmann F. *Serological diagnosis of Salmonella-species*. Copenhagen: Munksgaard 1972.
- 276.- Kelly MT, Brenner DJ, Farmer III JJ. *Enterobacteriaceae*. En: Lennette EH, Ballows A, Hausler Jr WJ, Shadomy HJ (eds). *Manual of clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington 1985, pp. 263-277.
- 277.- Kirby WMM. Extraction of highly potent penicillin inactivator from penicillin. *Science* 1944; 99: 452-453.
- 278.- Kitzis MD, Liassine N, Ferré B, Gutmann L, Acar JF, Goldstein F. In vitro activities of 15 oral  $\beta$ -lactams against *Klebsiella pneumoniae* harboring new extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1783-1786.
- 279.- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:302-307.
- 280.- Knothe H, Shah P, Kreméry V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandol and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11:315-317.
- 281.- Knox JR, Shlaes DM.  $\beta$ -lactamase mutants: correlations between altered properties and tertiary structure. 32nd ICAAC 1992; Libro de resúmenes, resumen 577, p. 207.

- 282.- Korfmann G, Sanders CC. AmpG is essential for high-level expression of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1989; **33**:1946-1951.
- 283.- Korfmann G, Wiedemann B. Genetic control of  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:793-799.
- 284.- Kresken M, Wiedemann B. Development of resistance in the past decade in central Europe. *J Antimicrob Chemother* 1986; **18**(Suppl C):235-242.
- 285.- Kuritza A, Oehler M. *Klebsiella* resistant to third-generation cephalosporins. 92nd ASM General Meeting 1992. Libro de resúmenes, resumen A-120. p. 21.
- 286.- Labia R, Morand A, Péduzzi J. Timentin and  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1986; **17**(Suppl C):17-26.
- 287.- Labia R, Morand A, Soilleux M, Scavizzi M. Identification of an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase with an unusual high rate of ceftazidime hidrolisis. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 1271, p. 1271.
- 288.- Labia R, Morand A, Tiwari K, Sirot J, Sirot D, Petit A. Interactions of new plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases with third generation cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:885-891.
- 289.- Lachapelle J, Quinn JP, Miyashiro D, Walmsley S, Bush K, Brunton JL, Levesque RC. Sequence of genes blaT-10 and blaT-11 which encode the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases TEM-10 and TEM-11. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 187. p. 118.
- 290.- Lee KY, Hopkins JD, O'Brien TF, Syvanen M. Gly-238-Ser substitution changes the substrate specificity of the SHV class A  $\beta$ -lactamases. *Proteins* 1991; **11**:45-51.
- 291.- Legrand P, Fournier G, Buré A, Jarlier V, Nicolas MH, Decré D, Duval J, Philippon A. Detection of extended broad-spectrum  $\beta$ -lactases in *Enterobacteriaceae* in Four French Hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; **8**:527-529.
- 292.- Levesque R, Roy P, Letarte R, Pechère JC. A plasmid-mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. *J Infect Dis* 1982; **145**:753-761.
- 293.- Levy SB. Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. *Lancet* 1982; **2**:83-88.
- 294.- Lindberg F, Lindquist S, Normark S. Induction of chromosomal  $\beta$ -lactamase expression in enterobacteria. *J Antimicrob Chemother* 1986; **18**(Suppl C):43-50.
- 295.- Lindberg F, Lindquist S, Normark S. Inactivation of *ampD* causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii*  $\beta$ -lactamase. *J Bacteriol* 1987; **169**:1923-1928.
- 296.- Lindberg F, Normark S. Contribution of chromosomal  $\beta$ -lactamases to  $\beta$ -lactam resistance in enterobacteria. *Rev Infect Dis* 1986; **8**(Suppl):S292-S304.
- 297.- Lindberg F, Normark S. Common mechanism of AmpC  $\beta$ -lactamase induction in enterobacteria: regulation of the cloned *Enterobacter cloacae* P99  $\beta$ -lactamase gene. *J Bacteriol* 1987; **169**:758-763.

- 298.- Lindberg F, Westman L, Normark S. Regulatory components in *Citrobacter freundii* *ampC*  $\beta$ -lactamase induction. Proc Natl Acad Sci USA 1985; **82**:4620-4624.
- 299.- Lindberg S, Lindberg F, Normark S. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA binding site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC*  $\beta$ -lactamase gene. J Bacteriol 1989; **171**:3746-3753.
- 300.- Lindquist S, Galleni M, Lindberg F, Normark S. Signalling proteins in enterobacterial AmpC  $\beta$ -lactamase regulation. Mol Microbiol 1989; **3**:1091-1102.
- 301.- Lindquist S, Lindberg F, Normark S. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autorregulation and activation of the inducible *ampC*  $\beta$ -lactamase. J Bacteriol 1989; **171**:3746-3753.
- 302.- Ling JM, Zhou GM, Woo THS, French GL. Antimicrobial susceptibilities and  $\beta$ -lactamase production of Hong-Kong isolates of gastroenteric salmonellae and *Salmonella typhi*. J Antimicrob Chemother 1991; **28**:877-885.
- 303.- Little JW, Mount DW. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell **29**:11-22.
- 304.- Liu PYF, Gur D, Hal LMC, Livermore DM. Survey of the prevalence of  $\beta$ -lactamases among 1000 gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. J Antimicrob Chemother 1992; **30**:429-447.
- 305.- Livermore DM.  $\beta$ -lactamases of *P. aeruginosa*. J Antimicrob Chemother; 1982; **10**:168-171.
- 306.- Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol 1987; **6**:439-445.
- 307.- Livermore DM. Chromosomal beta-lactamase induction and stable derepression in relation to antibiotic resistance in gram-negative bacteria. En: DM Livermore (ed). Beta-lactamases: Current Perspectives. Theracom Ltd, The Hague 1987, pp. 13-26.
- 308.- Livermore DM. Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. Drugs 1987; **34**(Suppl):64-88.
- 309.- Livermore DM. Resistance to  $\beta$ -lactams, and  $\beta$ -lactamase induction. En: Livermore MD. Current topics in infectious diseases and clinical microbiology. Braunschweig, Vieweg 1990, pp. 3-10.
- 310.- Livermore DM. Carbapenemases: The next generation of  $\beta$ -lactamases?. ASM News 1993; **59**:129-135.
- 311.- Livermore DM, Akova M, Wu P, Yang Y. Clavulanate and  $\beta$ -lactamase induction. J Antimicrob Chemother 1989; **24**(Suppl B):23-33.
- 312.- Livermore DM, Chau PY, Wong AIW, Leung PK.  $\beta$ -lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 1987; **20**:313-321.
- 313.- Livermore DM, Hall LMC, Gur D, Akova M, Akalin H. Non TEM-, non-SHV ceftazidimase transferable from a *P. aeruginosa* isolate. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 585, p.208.

- 314.- Livermore DM, Seetulsingh P. Susceptibility of *Escherichia coli* isolates with TEM-1  $\beta$ -lactamase combinations of BRL-42715, tazobactam, or clavulanate with piperacillin or amoxycillin. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**:761-767.
- 315.- Lodge JM, Minchin SD, Piddock LV, Busby SJW. Cloning, sequencing, and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal *ampC*  $\beta$ -lactamase. *Biochem J* 1990; **272**:627-631.
- 316.- Lodge JM, Piddock LJV. The control of class I  $\beta$ -lactamase expression in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1991; **28**:167-172.
- 317.- Lopardo H, Casimir L, Hernández C, Ruboglio EA. Isolation of three strains of beta-lactamase producing *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; **9**:402-405.
- 318.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265-275.
- 319.- Loza Fernández de Bobadilla E, Martínez-Beltrán J. Evolución de la actividad de cefotaxima en 6 años y fenotipos de sensibilidad en *Enterobacteriaceae*. *Enf Infec Microbiol Clin* 1988; **6**(Supl 1):3-13.
- 320.- Lujan R, Echeita A, Usera MA, Martínez-Suares JV, Alonso R, Sáez-Nieto JA. Plasmid profiles as an epidemiological marker for *Salmonella* serotype *enteritidis* foodborne outbreaks. *Microbiología* 1990; **6**:45-50.
- 321.- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetics basis. *Microbiol Rev* 1987; **51**: 88-134.
- 322.- Mabilat C, Courvalin P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:2210-2216.
- 323.- Mabilat C, Goussard S, Sougakoff W, Spencer RC, Courvalin P. Directed sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extended-broad-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid* 1990; **23**:27-34.
- 324.- Mabilat C, Legrand P, Duval J, Courvalin P. Analyse de la sequence nucleotidique du gene *blaT-8* codant la  $\beta$ -lactamase a spectre elargi TEM-8. *RICA* 1989. Libro de resúmenes, resumen 136/P12, p. 111.
- 325.- Mabilat C, Lourencaovital J, Goussard, Courvalin P. A new example of physical linkage between *tn1* and *tn21* - the antibiotic multiple-resistance region of plasmid *pcFFO4* encoding extended-spectrum beta-lactamase TEM-3. *Mol Gen Genet* 1992; **235**:113-121.
- 326.- MacDonald AA, Mapple PAC, Kibbler CC, George RC, Johson AP, Du Bois SK, Amyes SGB. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1991; **337**: 1609-1610.
- 327.- MacDonald KL, Coen ML, Hargrett-Bean NT, WellsJG, Puer ND, Colli SF, Blake PA. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. *J Am Med Assoc* 1987; **258**:1496-1499.



- 328.- MacGowan AP, Brown NM, Holt HA, Lovering AM, McCulloch SY, Reeves DS. An eight-year survey of the antimicrobial susceptibility patterns of 85,971 bacteria isolated from patients in a district general hospital and the local community. *J Antimicrobial Chemotherapy* 1993; 31:543-557.
- 329.- Mackenzie AMR, Ferris W. Prevalence of *K. pneumoniae* isolates with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Use of a novel satellitism fluorescence test. 33rd ICAAC 1993. Libro de resúmenes, resumen 243, p. 164.
- 330.- Machado J, Pato MVV, Sirot J. *Klebsiella pneumoniae* producing extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases: susceptibility patterns and hospital prevalence. RICA 1992. Libro de resúmenes, resumen 329/P20, p. 243.
- 331.- Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:1-5.
- 332.- Manavathu EK, Lerner SA, Fekete T, Perlin MH, Ziaja E, Price S. Characterization of a mutant TEM  $\beta$ -lactamase that confers resistance to ampicillin (amp) plus clavulanic acid (CA). 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 281, p. 133.
- 333.- Manavathu EK, Lerner SA, Mobashery S. Effect of aminoacid substitution at position 241 of TEM-1  $\beta$ -lactamase on inactivation by  $\beta$ -lactamase inactivators. 31st ICAAC 1991. Libro de resúmenes, resumen 16, p. 101.
- 334.- Manavathu EK, Zafaralla G, Mobashery S, Lerner SA. Resistance to ampicillin/clavulanate synergism by mutation of arg-244 in the TEM-1  $\beta$ -lactamase. 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology 1992. Libro de resúmenes, resumen A-114, p. 20.
- 335.- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- 336.- Mariotte S, Nordmann P, Nicolas MH. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in *Proteus mirabilis* may be limited by low frequency of plasmid conjugation. 31st ICAAC 1991. Libro de resúmenes, resumen 940, p. 255.
- 337.- Marshall MJ, Ross GW, Chanter KV, Harris AM. Comparison of the substrate specificities of the  $\beta$ -lactamases from *Klebsiella aerogenes* 1082E and *Enterobacter cloacae* P99. *Appl Microbiol* 1972; 23:765-769.
- 338.- Martínez JL, Cercenado E, Rodríguez-Creixems M, Vicente-Pérez MF, Delgado-Iribarren A, Baquero F. Resistance to beta-lactam/clavulanate. *Lancet* 1987; 2:1473.
- 339.- Martínez JL, Vicente MF, Delgado-Iribarren A, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:595.
- 340.- Martínez-Beltrán J. Resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. 1992.
- 341.- Martínez-Beltrán J, Cantón R. Betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado. En: R. Gómez-Lús, J. Garau (ed). Betalactamasas. Su importancia para el clínico. Madrid 1992, pp. 79-107.

- 342.- Martínez-Beltrán J, Cantón R. Recognizing  $\beta$ -lactamases by phenotypes. 6th ECCMID 1993. Symposium: New horizons in  $\beta$ -lactamases. pp 9-20.
- 343.- Martínez-Beltrán J, Cantón R, Pozuelo MJ, Ruíz-Serrano MJ, Añón MT, Baquero F. Efecto inductor de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de clase I de ac. clavulánico, sulbactam, tazobactam, y BRL-42715B. V Congreso SEIMC 1992. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1992; 10(Supl 2):77 (resumen 182).
- 344.- Martínez-Beltrán J, Cantón R, Ródenas E, León A, García-Marcos J, Loza E, Baquero F. Cefpirome: "in vitro" activity on gram negative blood isolates and strains with extended spectrum  $\beta$ -lactamases and *ompF* mutants. 17th ICC 1991. Libro de resúmenes, resumen 2077.
- 345.- Martínez-Beltrán J, Loza E, Bautista MJ, Cantón R, Ródenas E, Polanco A, Illescas S. Gram negative bacteremia 1988-1990: Distribution and antibiotic sensitivity profiles. 5th ECCMID 1991. Libro de resúmenes, resumen 1612.
- 346.- Martínez-Beltrán J, Loza E, Ródenas E, Catalán P, Cantón R, Baquero F. Cefminox (MT-141): Comparative activity with other cephamycins against bacteriemic isolates. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 875. p. 232.
- 347.- Martínez-Beltrán J, Loza E, Ródenas E, Catalán P, Morosini MI, Negri C, Cantón R, Baquero F. Meropenem: Estudio "in vitro" de un nuevo carbapenem con elevada actividad intrínseca. IV Congreso SEIMC 1990. Libro de resúmenes, resumen C3/12.
- 348.- Martínez-Beltrán J, Negri C, Morosini MC, Cantón R, Loza E, Baquero F, Papanicolaou G, Medeiros A. Acquisition of a new plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase in a intrahospitalary *Salmonella arizonae* outbreak. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 185, p. 117.
- 349.- Martínez-Beltrán J, Papa E, Loza E, Cantón R, Medeiros AA. Decreased susceptibility to 3rd generations cephalosporins and monobactams in *Escherichia coli* hyperproducing OXA-1 and chromosomal class I  $\beta$ -lactamases. 5th ECCMID 1991. Libro de resúmenes, resumen 112, p. 23.
- 350.- Martínez-Beltrán J, Ródenas E, Matín-Palomeque P, Cantón R, Loza E, Pozuelo MJ, Ruíz LM, Baquero F. Cefdinir (CI-983, FK-482), antimicrobial profile. 10th Futures Trends in Chemotherapy 1992. Libro de resúmenes, resumen 98.
- 351.- Marre R, Aleksic S.  $\beta$ -lactamase types and  $\beta$ -lactam resistance of *Escherichia coli* strains with chromosomally mediated ampicillin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:44-46.
- 352.- Massida O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo  $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol* 173:4611-4617.
- 353.- Masuda G, Tomioka S, Hasegawa M. Detection of  $\beta$ -lactamase production by gram-negative bacteria. *J Antibiot* 1976; 24:662-664.
- 354.- Matsubara N, Yotsuji A, Kumanu K, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and some properties of a cephalosporinase from *Proteus vulgaris*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19:185-187.
- 355.- Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxymino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:1243-1246.

- 356.- Matthew M. Plasmid-mediated beta-lactamase of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; **5**:349-358.
- 357.- Matthew M, Harris AM. Identification of  $\beta$ -lactamase by analytical isoelectric focusing: correlation with bacterial taxonomy. *J Gen Microbiol* 1986; **94**:55-67.
- 358.- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; **88**:169-178.
- 359.- Matthew M, Hedges RW, Smith JT. Types of  $\beta$ -lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1979; **138**:657-662.
- 360.- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3ª Edición. Churchill Livingstone, New York 1990, pp. 218-228.
- 361.- McGhie D. Detection of  $\beta$ -lactamase activity of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Pathol* 1977; **30**:585-587.
- 362.- Medeiros AA. Beta-lactamases. *Br Med Bull* 1984; **40**:18-27.
- 363.- Medeiros AA. Plasmid-determined betalactamases. En: LE Bryan (ed), *Handbook of experimental pharmacology*, vol.91. Microbial resistance to drugs. Springer-Verlag, Berlin 1989, pp. 101-127.
- 364.- Medeiros AA, Bauernfeind A, Papanicolaou G, Hare RS, Papa E, Miller G. Novel extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases found in survey of enterobacteria from U.S. hospitals. 29th ICAAC 1989. Libro de resúmenes, resumen 670, pp. 213.
- 365.- Medeiros AA, Cohenford M, Jacoby GA. Five novel plasmid determined  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **27**:715-719.
- 366.- Medeiros AA, Jacoby GA. Beta-lactamase-mediated resistance. En: SF Queener, JA Webber, SW Queener (eds), *Beta-Lactam Antibiotics for Clinical Use*. Dekker, New York 1986, pp. 49-84.
- 367.- Medeiros AA, Kent RL, O'Brien TF. Characterization and prevalence of the different mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; **6**:791-801.
- 368.- Medeiros AA, Martínez-Beltrán J, Papa EF, O'Gara C. Comparative efficacy of  $\beta$ -lactamase inhibitor/antibiotic combinations against clinical isolates of *E. coli* producing different amounts of  $\beta$ -lactamase. 28th ICAAC 1988. Libro de resúmenes, resumen 491, p. 195.
- 369.- Medeiros AA, O'Brien TF, Rosenberg EY, Nikaido H. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J Infect Dis*, 1987; **156**:751-757.
- 370.- Mengaud J, Vicente MF, Chenevert J, Pereira JM, Geoffroy C, Gicquel-Sanzey B, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Cossart P. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1988; **56**: 766-772.

- 371.- MENSURA-II and MENSURA-III: Two meetings of the Spanish Working Group on Antibiotic Susceptibility Testing. *Rev Esp Quimioterap* 1992; **5**:354-355.
- 372.- Mercier J, Levesque RC. Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6  $\beta$ -lactamases and sequencing of SHV-1  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:1577-1584.
- 373.- Merck Sharp & Dohme Research Laboratories. Estudio sobre la incidencia de multirresistencia en gram-negativos aislados en forma seriada. 1992.
- 374.- Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Int Med* 1993; **119**:353-358.
- 375.- Miller GH, Hare RS, Moos LE, Sabatelli FJ, Waitz JA. Survey of aminoglycoside modifying enzymes, in 20 UK centres. *J Antimicrob Chemother* 1980; **22**:823-839.
- 376.- Miller JH. Experiments in Molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, 1972.
- 377.- Minami S, Inoue S, Mitsuhashi S. Purification and properties of a cephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **18**:853-857.
- 378.- Mitsuhashi S, Inoue M. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. En: S Mitsuhashi (Ed), *Beta-lactam antibiotics*. Springer, 1981, p. 41.
- 379.- Mitsuyama J, Iruma R, Yamaguchi A, Saway T. Identification of porins in the outer membrane of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* spp. and their role in outer membrane permeation of  $\beta$ -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**:379-384.
- 380.- Mitsuyama J, Itoh Y, Takahata M, Okamoto S, Yasuda T. In vitro antibacterial activities of tosylfloxacin against and uptake of tosylfloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1992; **36**:2030-2036.
- 381.- Moellering RC.  $\beta$ -lactamase inhibition: Therapeutic implications in infectious diseases. An overview. *Rev Infect Dis* 1991; **13**(Suppl 9):S723-S726.
- 382.- Montgomerie J. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infec Dis* 1979; **1**:736-753.
- 383.- Moosdeen F, Keeble J, Williams JD. Induction/inhibition of chromosomal  $\beta$ -lactamases by  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Rev Infect Dis* 1986; **8**(Suppl 5):S562-S568.
- 384.- Moritz VA, Carson PBD. Cefoxitin sensitivity as a marker for inducible beta-lactamases. *J Med Microbiol* 1986; **21**:203-207.
- 385.- Mulgrave L. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Australia. *Med J Aust* 1990; **152**:444-445.
- 386.- Muñoz P, Díaz MD, Rodríguez-Creixems M, Baraira J, Bernaldo de Quirós JCL, Nieto P, From C. Antimicrobial resistance of clinical isolates of non-typhoid *Salmonella*. 31th ICAAC 1991. Libro de resúmenes, resumen 110, p. 110.

- 387.- Muñoz P, Díaz MD, Rodríguez-Creixems M, Cercenado C, Peláez P, Bouza E. Antimicrobial resistance of *Salmonella* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:1200-1202.
- 388.- Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable  $\beta$ -lactamase, a new mechanism for "in vitro" penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest* 1983; **72**: 1168-1171.
- 389.- Murray BE, Mederski-Samoraj B, Foster SK, Bruton LJ, Hardford P. In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. *J Clin Invest* 1986; **77**: 289-293.
- 390.- Naas T, Mariotte S, Nordmann T. A carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*: sequence analysis and regulation. 6th ECCMID 1993. Libro de Resúmenes, resumen 478, p. 150.
- 391.- Nakamura S, Inoue S, Simuzu M, Iyobe S, Mitsuhashi S. Inhibition of conjugal transfer of R plasmid by pipemidic acid related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; **10**: 779-785.
- 392.- Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, Yoshida H. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**:254-255.
- 393.- Nandivada LS, Amyes SGB. SAR-2: identification of a novel plasmid-encoded  $\beta$ -lactamase from India. *FEMS Microbiol Lett* 1989; **57**:219-221.
- 394.- Nandivada LS, Amyes SGB. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactam resistance in pathogenic gram-negative bacteria isolated in South India. *J Antimicrob Agents Chemother* 1990; **26**:279-290.
- 395.- Nandivada LS, Lewin CS, Amyes SGB. Bacterial resistance to the combination of ampicillin and clavulanic acid. 90th ASM Meeting 1990. Libro de resúmenes, resumen A-87, p. 15.
- 396.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A3. NCCLS, Villanova PA. 1984.
- 397.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A. NCCLS, Villanova PA. 1985.
- 398.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A4. NCCLS, Villanova PA. 1990.
- 399.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A2. NCCLS, Villanova PA. 1990.
- 400.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourth International supplement. NCCLS M100-S4, Villanova PA. 1992.
- 401.- Naumovski L, Quinn J, Miyashiro D, Patel M, Bush K, Singer S, Graves D, Palzkill, Arvin AM. Outbreak of ceftazidime resistance to a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrobial Agents Chemother* 1992; **36**:1991-1996

- 402.- Nayler JHC. Resistance to  $\beta$ -lactams in gram-negative bacteria: relative contributions of  $\beta$ -lactamase and permeability limitations. *J Antimicrob Chemother* 1987; **19**:713-732.
- 403.- Neu HC. Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. In: V Lorian (ed). *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore 1986. pp. 757-789.
- 404.- Neu HC. Penicillin-binding-proteins and beta-lactamases: their effects on the use of cephalosporins and other new beta-lactams. En: JS Remington, MN Swartz (eds). *Current Clinical Topics in Infectious Diseases Vol 8* 1987, pp. 37-61.
- 405.- Nicolas MH, Honore N, Jarlier V, Philippon A, Cole ST. Molecular genetic analysis of cephalosporinase production and its role in  $\beta$ -lactam resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**:295-299.
- 406.- Nicolas MH, Jarlier V, Honore N, Philippon A, Cole ST. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3  $\beta$ -lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 1989; **33**:2096-2100.
- 407.- Nicolas MH, Philippon A, Cole ST. Cefotaxime resistance in *E. coli* related to the amplification of the gene encoding SHV-3  $\beta$ -lactamase. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 276, p. 132.
- 408.- Nikaido H. Role of permeability barriers in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1985; **27**:197-231.
- 409.- Nikaido H. Bacterial resistance to antibiotics as a function of outer membrane permeability. *J Antimicrob Chemother* 1988; **22**(Suppl A):17-22.
- 410.- Nikaido H. Role of the outer membrane of gram-negative bacteria in antimicrobial resistance. En: LE Bryan (ed), *Microbial Resistance to Drugs*. Springer-Verlag, Berlin 1989. pp 1-34.
- 411.- Nikaido H, Liu W, Rosenberg EY. Outer membrane permeability and  $\beta$ -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:337-342.
- 412.- Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985; **45**:1-32.
- 413.- Nordic Council Medicine. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index. Oslo 1993.
- 414.- Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* cloning of the gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:939-946.
- 415.- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:962-969.
- 416.- Normark S, Bartowsky E, Lindquist S, Galleni M, Tuomanen E, Martin HH, Schmidt H. The molecular basis of  $\beta$ -lactamase induction in enterobacteria. En: HC Neu (ed). *New antibacterial strategies*. Churchill Livingstone Inc, New York 1990. pp. 161-173.

- 417.- Normark S, Edlund T, Grundström T, Bergström S, Wolf-Watz H. *Escherichia coli* K-12 mutants hyperproducing chromosomal  $\beta$ -lactamase by gene repetitions. *J Bacteriol* 1977; **132**:912-922.
- 418.- Normark S, Lindquist S, Lindberg F. Chromosomal beta-lactam resistance in Enterobacteria. *Scand J Infect Dis* 1986; **49**(Suppl):38-45.
- 419.- Novick RP. Analysis by transduction of mutation affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 1963; **33**:121-136.
- 420.- Nugent ME, Hedges RW. The nature of the determinant for the SHV-1  $\beta$ -lactamase. *Mol Gen Genetics* 1979; **175**:239-243.
- 421.- O'Brien T, and the International Survey of Antibiotic Resistance Group. Resistance to antibiotics at medical centres in different parts of the world. *J Antimicrob Chemother* 1986; **18**(Suppl C):243-253.
- 422.- O'Callaghan CH, Morris A, Kirby S, Shingler AH. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; **1**:283-288.
- 423.- Okonogi K, Kuno M, Higashide E. Induction of  $\beta$ -lactamase in *Proteus vulgaris*. *J Gen Microbiol* 1986; **132**:143-150.
- 424.- Oliphant AR, Struhl K. An efficient method for generating proteins with altered enzymatic properties: application to  $\beta$ -lactamase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:9094-9098.
- 425.- Oliva B, Segatore B, Amicosante G, Franceschini N, Oratore A, Bennett PM. Broad spectrum  $\beta$ -lactamases of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 1990; **25**:335-341.
- 426.- Olsson O, Bergström S. AmpC  $\beta$ -lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc Natl Acad Sci* 1983; **80**:7556-7560.
- 427.- Olsson-Liljequist B, Dornbusch K, Nord CE. Characterization of three different  $\beta$ -lactamases from *Bacteriodes fragilis* group. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **18**:220-225.
- 428.- Olleon M, Mulder R, Gayral JP. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in the Viteck System. 31st ICAAC 1991; Libro de resúmenes, resumen 170. p. 127.
- 429.- Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:7378-7382.
- 430.- Ozanne B, Beneviste R, Tipper D, Davies J. Aminoglycoside antibiotics: inactivation by fosforilation in *Escherichia coli* carrying R factors. *J Bacteriol* 1969; **100**:1144-1146.
- 431.- Pagani L, Ronza P, Giacobone E, Romero E. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas conferring resistance to third generation cephalosporins and cephamycins in *Klebsiella pneumoniae*. 6th ECCMID 1993; Libro de resúmenes, resumen 477, p. 150.

- 432.- Page JWJ, Farmer TH, Elson SH. Hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase by *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 1989; 23:160-161.
- 433.- Pagon B, Bizet C, Buré A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, Gutmann L. In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3  $\beta$ -lactamase. J Infect Dis 1989; 159:1005-1006.
- 434.- Papanicolaou GA, Medeiros AA. Discrimination of extended spectrum  $\beta$ -lactamases by a novel nitrocefin competition assay. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:2184-2192.
- 435.- Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and o-methoxy  $\beta$ -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:2200-2209.
- 436.- Parker AC, Smith CJ. Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A  $\beta$ -lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. Antimicrobial Agents Chemother 1993; 37:1028-1036.
- 437.- Paul GC, Gerbaud G, Bure A, Philippon AM, Pagon B, Courvalin P. TEM-4, a new plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1958-1963.
- 438.- Payne DJ, Amyes SGB. Transferable resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactams: a major threat or a minor inconvenience? J Antimicrob Chemother 1991; 27:255-261.
- 439.- Payne DJ, Blakemore PH, Drabu YJ, Amyes SGB. Comparison of TEM-E3 and TEM-5  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother 1989; 24:615-617.
- 440.- Payne DJ, Hood J, Marriott MS, Amyes SGB. Separation of plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by fast protein liquid chromatography (FPLC system). FEMS Microbiol Lett 1990; 69:195-200.
- 441.- Payne DJ, Knowles DC. Plasmid mediated class-I  $\beta$ -lactamases. 6th ECCMID 1993. Libro de resúmenes, resumen 482, p. 151.
- 442.- Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB. TEM-E1: a novel  $\beta$ -lactamase conferring resistance to ceftazidime. FEMS Microbiol Lett 1989; 59:97-100.
- 443.- Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB. Mutants of the TEM-1  $\beta$ -lactamase conferring resistance to ceftazidime. J Antimicrob Chemother 1989; 24:103-110.
- 444.- Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB. Characterization of a unique ceftazidime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, TEM-E2. J Med Microbiol 1990; 32:131-134.
- 445.- Payne DJ, Woodford N, Amyes SGB. Characterization of the plasmid mediated  $\beta$ -lactamase BIL-1. J Antimicrob Chemother 1992; 30:119-127.
- 446.- Péduzzi J, Barthélémy M, Tiwari K, Mattioni D, Labia R. Structural features related to hydrolytic activity against ceftazidime of plasmid-mediated SHV-type CAZ-5  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:2160-2163.



- 447.- Petit A, Ben Yaghlane-Bousslama H, Sofer L, Labia R. Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in *Enterobacteriaceae* ?. FEMS Microbiol Lett 1992; 92:89-94
- 448.- Petit A, Ben-Yaghlane-Bousslama H, Sofer L, Labia R. Characterization of chromosomally encoded penicillinases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1992; 29:629-638.
- 449.- Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1)  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:219-224.
- 450.- Petit A, Sirot DL, Chanal CM, Sirot JL, Labia R, Gerbaud G, Cluzel RA. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:626-630.
- 451.- Philippon A, Ben Redjeb S, Fournier G, Ben Hassen A. Epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamases. Infection 1989; 17:347-354.
- 452.- Philippon A, Fournier G, Paul G, Vedel G, Nevot P. Detection et distribution des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi chez les Enterobacteries. Méd Mal Infect 1988; 12:869-876.
- 453.- Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1131-1136.
- 454.- Philippon AM, Paul GC, Thabaut AP, Jacoby GA. Properties of a novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-4) specified by an IncP-2 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29:519-520.
- 455.- Phillips I. Prevalence and clinical importance of class I  $\beta$ -lactamases. Introduction. Rev Infect Dis 1988; 10:823.
- 456.- Phillips I, Culebras E, Moreno F, Baquero F. Induction of the SOS response by 4-quinolones. J Antimicrob Chemother 1987; 20:631-638.
- 457.- Phillips I, Shannon K. Aminoglycoside resistance. Br Med Bull 1984; 40:28-35.
- 458.- Piddock LJV, Hall MC, Walters RN. Phenotypic characterization of quinolone-resistant mutants of *Enterobacteriaceae* selected from wild type, *gyrA* type and multiply-resistant (*marA*) type strains. J Antimicrob Chemother 1991; 28:185-198.
- 459.- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett Appl Microbiol 1989; 8:151-156.
- 460.- Pitton JS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. En: Adrian RH, Holzer H, Jung R, Kramer K, Kraye O, Lynen F, Meischer PA, Rasmunssen H, Renold AE, Trendelenburg U, Vogt W, Weber HH (eds). Reviews of physiology. Biochemistry and experimental pharmacology, Vol 65. Springer-Verlag, Berlin 1972. pp. 15-93.
- 461.- Platt DJ, Black AC. Plasmid ecology and the elimination of plasmids by 4-quinolones. J Antimicrob Chemother 1987; 20:137-142.

- 462.- Piorde JJ, Sherris JC. Staphylococcal resistance to antibiotics: origin, measurement and epidemiology. *Ann NY Acad Sci* 1974; **236**:413-434.
- 463.- Podbielski A, Melzer B. Nucleotide sequence of the gene encoding the SHV-2  $\beta$ -lactamase (*bla*<sub>SHV-2</sub>) of *Klebsiella ozaenae*. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**:4916.
- 464.- Podbielski A, Schonling J, Melzer B, Haase G. Different promoters of the SHV-2 and SHV-2a  $\beta$ -lactamase lead to diverse levels of cefotaxime resistance in their bacterial producers. *J Gen Microbiol* 1991; **137**:1667-1675.
- 465.- Podbielski A, Schonling J, Melzer B, Warnatz K, Leusch HG. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type  $\beta$ -lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. *J General Microbiol* 1991; **137**:569-578.
- 466.- Podglajen I, Breuil J, Coutrot A, Gutmann L, Collatz E. Incidence of the carbapenem resistance gene *cfiA* and variability of its genomic environment in carbapenem-resistant and -susceptible clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 583, p. 208.
- 467.- Poupart MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**:1498-1500.
- 468.- Pozuelo MJ, Cantón R, MJ Ruiz-Serrano, Ródenas E, Loza E, Martínez-Beltrán J. Absence of inducer effect of BRL 42715B on *Enterobacter* and *P. aeruginosa* Class I  $\beta$ -lactamases. 32nd ICAAC 1992. Libro de resúmenes, resumen 1279, p. 324.
- 469.- Pujol I, Ballester F, Sans T, Graell F, Rodríguez ML, Joven J. Resistencia antibiótica en aislamiento clínicos de *Salmonella* procedentes de coprocultivos. IV Congreso SEIMC 1990. Libro de Resúmenes, resumen F-34.
- 470.- Punyagupta M, Quinn J, Miyashiro D, Bush K. Novel extended-spectrum plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase hydrolyzing ceftazidime in *Klebsiella pneumoniae*. 30th ICAAC 1990. Libro de resúmenes, resumen 188, p. 118.
- 471.- Quinn JP. Novel plasmid-mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Infect Dis Newslett* 1992; **11**:33-37.
- 472.- Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R, Bush K. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**:1451-1456.
- 473.- Rasmunssen BA, Bradford A, Quinn JP, Wiener J, Weinstein RA, Bush K. Genetically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single centre: biochemical and genetic characterization of TEM-10  $\beta$ -lactamase encoded by different nucleotide sequences. *Antimicrob Agent Chemother* 1993; **37**:1989-1992.
- 474.- Reeves DS, Bywater MJ, Holt HA. The activity of cefpirome and ten other antibacterial agents against 2858 clinical isolates collected from 20 centres. *J Antimicrobial Chemother* 1993; **31**:345-362.
- 475.- Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Martínez JL. Synergistic effect of dosage and bacterial inoculum in TEM-1 mediated antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; **7**:778-779.

- 476.- Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Martínez JL. Factors determining resistance to  $\beta$ -lactam combined with  $\beta$ -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**:569-575.
- 477.- Reid AJ, Simpson IN, Harper PB, Amyes SGB. Identification and characterization of a novel  $\beta$ -lactamase TLE-2, encoded by plasmid pUK702. *FEMS Microbiol Lett* 1987; **44**:125-128.
- 478.- Reig R, Roy C, Hermida M, Teruel D, Coria A. A survey of  $\beta$ -lactamases from 618 *Klebsiella* spp. *J Antimicrob Chemother* 1993; **31**:29-35.
- 479.- Reina J, Salva F, Gil J, Parras F, Alomar P. Sensibilidad antibiótica en los diferentes serotipos de *Salmonella* aislados en coprocultivos. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; **4**:489-492.
- 480.- Reynaud A, Péduzzi J, Barthélémy M, Labia R. Cefotaxime-hydrolyzing activity of the  $\beta$ -lactamase of *Klebsiella oxytoca* D488 could be related to a threonine residue at position 140. *FEMS Microbiol Letters* 1991; **81**:185-192.
- 481.- Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Jacoby GA. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:2193-2199.
- 482.- Rice LB, Yao JDC, Klimm GM, Eliopoulos GM, Moellering Jr. RC. Efficacy of different  $\beta$ -lactams against and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the rat intra-abdominal abscess model. *Antimicrob Agent Chemother* 1991; **35**:1243-1244.
- 483.- Richard C, Philippon A, M'Boup S, Vieu JF. Epidemiologie des infections pediatriques a *Klebsiella* dans deux hopitaux de Dakar. Production de  $\beta$ -lactamase a spectre elargi (1987-1988). *Med Mal Infect* 1989; **19**: 753-759.
- 484.- Richmond MH. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 1965; **94**:584-593.
- 485.- Richmond MH, Sykes RB. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. En: AH Rose, DW Tempest (ed). *Advances in Microbial Physiology* Vol 9. Academic Press, Londres 1973, pp. 31-88.
- 486.- Ritter E, Bauernfeind A, Becker-Boost E, Fiehn A, Stocker H, Wirsing von Koning CH, Finger H. Ausbruch einer nosokomialen infektion durch SHV2-betalaktamase-bildende *Klebsiella pneumoniae*-stamme in einer operativen intensivstation. *Immun Infekt* 1992; **20**:3-6.
- 487.- Rivera MJ, Rivera N, Castillo J, Rubio MC, Gómez-Lus R. Molecular and epidemiology study of *Salmonella* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1991; **29**:927-932.
- 488.- Rolinson GN. Inducible  $\beta$ -lactamase and resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Drug Dev* 1989; **2**(Suppl 1):43-46.
- 489.- Rossi MA, Gutkind G, Quinteros M, Marino M, Couto E, Tokumoto M, Woloj M, Miller G, Medeiros A. A *Proteus mirabilis* with a novel extended spectrum betalactamases and six different aminoglycoside resistance genes. 31st ICAAC 1991, Libro de resúmenes, resumen 939, p 255.

- 490.- Roy C, Del Valle O, Reig R, Hermida M, Bartolomé R. *Salmonella* productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas con fenotipo CTX. XIII Congreso SEM 1991. Libro de resúmenes, resumen PM-106.
- 491.- Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid-determined  $\beta$ -lactamasas identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12:507-510.
- 492.- Roy C, Segura C, Tirado M, Reig R, Hermida T, Teruel D, Foz A. Frequency of plasmid-determined  $\beta$ -lactamasas in 680 consecutively isolated strains of *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4:146-147.
- 493.- Roy C, Segura C, Torrellas A, Reig R, Teruel D, Hermida M. Activity of amoxicillin/clavulanate against  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24(Suppl B):41-47.
- 494.- Roy C, Teruel D, Reig R, Hermida M, Teixel M.  $\beta$ -lactamasas and susceptibility phenotypes to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:593-594.
- 495.- Roy C, Tirado M, Reig R, Hermida M, Del Valle O, Vidal R. *Enterobacteriaceae* with expanded-spectrum  $\beta$ -lactamasas isolated in the Barcelona area. 7th Mediterranean Congress of Chemotherapy 1990. Libro de resúmenes, resumen 600, p. 143.
- 496.- Roy C, Tirado M, Reig R, Hermida M, Del Valle O, Vidal R. *Enterobacteriaceae* with plasmid-determined expanded-spectrum  $\beta$ -lactamasas isolated in the Barcelona area. *J. Chemother* 1991; 3 (Supl 4):153-155.
- 497.- Saino Y, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN12873. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25:362-365.
- 498.- Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and some properties of inducible penicillin  $\beta$ -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22:564-570.
- 499.- Sambrook J, Firtsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- 500.- Samuni A. A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the  $\beta$ -lactamase reaction. *Annal Biochem* 1975; 63:17-26.
- 501.- Sánchez-Moreno MP, Carbonero R, Mingo M, Antón T, Cantón R. Prevalencia de serotipos y antibiotipos en *Salmonella* procedentes de alimentos y manipuladores. VIII Reunión Científica del Grupo de Microbiología de los Alimentos 1992. Libro de resúmenes, p. 43.
- 502.- Sanders CC. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41:573-593.
- 503.- Sanders CC. The chromosomal beta-lactamasas. En: LE Bryan (Eds), *Microbial resistance to drugs*. Springer-Verlag, New York 1989, pp. 130-149.
- 504.- Sanders CC.  $\beta$ -lactamasas of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1089-1099.

- 505.- Sanders CC, Iaconis JP, Bodey GP, Samonis G. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*: role of PSE-1  $\beta$ -lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:1365-1369.
- 506.- Sanders CC, Sanders WE Jr. Microbial resistance to newer generation  $\beta$ -lactam antibiotics: clinical implications. *J Infect Dis* 1985; **151**:399-405.
- 507.- Sanders CC, Sanders WE Jr. Type I  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: interactions with  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Infect Dis* 1986; **154**:792-800.
- 508.- Sanders CC, Sanders WE Jr.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1993; **15**:824-839.
- 509.- Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV, Wermer V. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones,  $\beta$ -lactams, and aminoglycosides with especial references to cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrobial Agents Chemother* 1984; **26**:797-801.
- 510.- Sanders CC, Sanders WE Jr, Moland ES. Characterization of  $\beta$ -lactamases in situ on polyacrylamide gels. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **30**:918-925.
- 511.- Sanders CC, Watanakunakorn C. Emergence of resistance to  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and quinolones during combination therapy for infections due to *Serratia marcescens*. *J Infect Dis*, 1986; **153**: 617-619.
- 512.- Sanders CH. New  $\beta$ -lactams: new problems for the internist. *Ann Intern Med* 1991; **115**:650-651.
- 513.- Sanders WE, Sanders CH. Inducible  $\beta$ -lactamases: Clinical and epidemiology implications for use of new cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:830-838.
- 514.- Sanderson KE, Hurley J. Linkage map of *Salmonella typhimurium*. En: FC Neidhardt, JL Ingraham, KB Low, Magasanik B, Schaechter M, Umbarger HE (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology Vol 2. ASM, Washington 1987, pp. 877-918.
- 515.- Sato K, Fujii T, Okamoto R, Inoue M, Mitsunashi S. Biochemical properties of  $\beta$ -lactamase produced by *Flavobacterium odoratum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **27**:612-614.
- 516.- Sawai T, Hiruma R, Kawana N, Kaneko M, Taniyasu F, Inami A. Outer membrane permeation of  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982; **22**:585-592.
- 517.- Sawai T, Kanno M, Tsukamoto K. Characterization of eight  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1982; **152**:267-271.
- 518.- Sawai T, Mitsunashi S, Yamagishi S. Comparison of  $\beta$ -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to p-aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol* 1968; **12**:423-434.
- 519.- Schultz S, Richards J. Site-saturation studies of  $\beta$ -lactamases: production and characterization of mutant  $\beta$ -lactamases with all possible aminoacid substitutions at residue 71. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**:1588-1592.

- 520.- Schwalbe RS, Hoge CW, Morris JG, O'Halon PN, Crawford RA, Gillian PH. In vivo selection for transmissible drug resistance in *Salmonella typhi* during antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:161-163.
- 521.- Seeberg AH, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Chromosomal  $\beta$ -lactamases of *Enterobacter cloacae* are responsible for resistance to third generation cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; **23**:918-925.
- 522.- Shah PM, Asanger R, Kaham FM. Incidence of multi-resistance in gram-negative aerobes from intensive care units of 10 German hospitals. *J Scan Infect Dis* 1991; **78**(Suppl): 22-34.
- 523.- Shah PM, Stille W. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than to third generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1983; **11**:597-601.
- 524.- Shannon K, King A, Phillips I. Prevalence of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli* isolated from blood from 1969-1991. *J Antimicrob Chemother* 1992; **30**:661-672.
- 525.- Shannon K, Williams H, King A, Phillips I. Hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* serotype O15. *FEMS Microbiol Lett* 1990; **67**: 319-324.
- 526.- Shannon KP, King A, Phillips I, Nicolas MH, Philippon A. Importation of organisms producing broad-spectrum SHV-group  $\beta$ -lactamases into the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 1990; **25**:343-351.
- 527.- Shenn LL, Pernet AG. Mechanisms of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: the target of drugs in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:307-311.
- 528.- Shimizu K, Kumada T, Hsieh WC, Chung HY, Chong Y, Hare RS, Miller GH, Sabatelli FJ, Howard J. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa and Korea, Chile and the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**:282-288.
- 529.- Shlaes DM, Currie-McCumber C, Hull A, Behlau I, Kron M. OHIO-1  $\beta$ -lactamase is part of the SHV-1 family. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:1570-1576.
- 530.- Sigal IS, Harwood BG, Arentzen R. Thiol- $\beta$ -lactamases: replacement of the active-site serine RTem  $\beta$ -lactamase by a cystein residue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**:7157-7160.
- 531.- Simpson IN, Harper PB, O'Callaghan CH. Principal  $\beta$ -lactamases responsible for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **17**:929-936.
- 532.- Sirot D, Champs de C, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Sirot J. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**:1576-1581.
- 533.- Sirot D, Chanal C, Labia R, Meyran M, Sirot J, Cluzel R. Comparative study of five plasmid-mediated ceftazidimases isolated in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1989; **24**:509-521.
- 534.- Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J. Susceptibility of new  $\beta$ -lactams to the expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-1. *Infection* 1989; **17**: 28-30.

- 535.- Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J, Cluzel R. *Escherichia coli* clinical isolates producing a new TEM-type mutant resistant to  $\beta$ -lactamase inhibitors. 12th RICA 1992. Libro de resúmenes, resumen 25/C3.
- 536.- Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. J Antimicrob Chemother 1987; 20:323-334.
- 537.- Sirot D, Sirot J, Saulnier P, Joly M, Chanoal M, Cluzel M, Cluzel R. Resistance to  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae*: Distribution of phenotypes related to  $\beta$ -lactamase production. J Int Med Res 1986; 14:193-199.
- 538.- Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, Meyran M, Morel C, Perz R, Quentin-Noury C, Reverdy ME, Scheftel JM, Rosenbaum M, Rezvani Y. Resistance to cefotaxime and seven other  $\beta$ -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:1677-1681.
- 539.- Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases markedly active against third generation cephalosporins: epidemiologic studies. Rev Infect Dis 1988; 10:850-859.
- 540.- Sirot J, Labia R, Thabaut A. *Klebsiella pneumoniae* strains more resistant to ceftazidime than other third generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1987; 20:611-612.
- 541.- Smith CE, Tillman BS, Howell AW, Longfield RN, Jorgensen JH. Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:1290-1293.
- 542.- Smith JT. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. J Antimicrob Chemother 1986; 18(Suppl D):21-29.
- 543.- Snyderman DR. Clinical implications of multi-drug resistance in the intensive care unit. Scand J Infect Dis 1991; 78(Suppl):54-63.
- 544.- Société Française de Microbiologie. Communiqué 1992 du Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Pathol Biol (Paris) 1992; 40:741-748.
- 545.- Sogaard P. Resistance types in *Escherichia coli*. I Occurrence and resistance to ampicillin, carbenicillin and cephalothin. Acta Path Microbiol Scand Sect B 1979; 87:235-241.
- 546.- Sogaard P. Resistance types in *Escherichia coli*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B 1983; 51:49-54.
- 547.- Sougakoff W, Goussard S, Courvalin P. The TEM-3  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. FEMS Microbiol Lett 1988; 56:343-348.
- 548.- Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev Infect Dis 1988; 10:879-884.

- 549.- Sougakoff W, Petit A, Goussard S, Sirot D, Bure A, Courvalin P. Characterization of the plasmid genes *blaT-4* and *blaT-5* which encode the broad-spectrum  $\beta$ -lactamases TEM-4 and TEM-5 in *Enterobacteriaceae*. *Gene* 1989; **78**:339-348.
- 550.- Sousa JC, Carneiro G, Peixe ML, Queirós ML, Rebelo I. Characterization of  $\beta$ -lactamases encoded by pathogenic strains of *Escherichia coli* from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**:437-440.
- 551.- Soweck JA, Singer SB, Ohringer S, Malley MF, Dougherty TJ, Gougoutas JZ, Bush K. Substitution of lysine at position 104 or 240 of TEM-1<sub>pTZ18R</sub>  $\beta$ -lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam. *Biochemistry* 1991; **30**:3179-3188.
- 552.- Spencer RC, Wheat PF, Winstanley TG, Cox DM, Pledsted SJ. Novel  $\beta$ -lactamase in a clinical of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1987; **20**:919-921.
- 553.- Spratt BG. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. In: LE Bryan (Ed), *Microbial Resistance to Drugs*. Springer-Verlag, New York 1989, pp. 77-100.
- 554.- Spratt BG, Cromie KD. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:699-711.
- 555.- Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inoculating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotic Chemother* 1959; **9**:307-311.
- 556.- Stobberingh EE. Induction of chromosomal  $\beta$ -lactamases by different concentrations of clavulanic acid in combination with ticarcillin. *J Antimicrob Chemother* 1988; **21**:9-16.
- 557.- Strynadka NCJ, Adachi H, Jensen SE, Johns K, Sielecki A, Betzel C, Sutoh K, James MNG. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in  $\beta$ -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* 1992; **359**:700-705.
- 558.- Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of the *Escherichia coli* pBR322. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**:3737-2741.
- 559.- Sykes RB. The classification and terminology of enzymes that hydrolyze  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Infect Dis* 1982; **145**:762-765.
- 560.- Sykes RB, Matthew M. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; **2**:115-157.
- 561.- Tajima M, Masuyoshi S, Inoue M, Takenouchi Y, Sagawara S, Mitsuhashi S. Purification and properties of  $\beta$ -lactamases from *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* 1981; **126**:179-184.
- 562.- Tajima M, Sawa K, Watanabe K, Ueno K. The  $\beta$ -lactamases of the genus *Bacteroides*. *J Antibiot* 1983; **36**:423-428.
- 563.- Tajima M, Takenouchi Y, Ohya S, Sugawara S. Purification and properties of  $\beta$ -lactamase from *Proteus vulgaris*. *Microbiol Immunol* 1982; **26**:531-534.



- 564.- Tajima M, Takenouchi Y, Sugawara S, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of chromosomally mediated  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter freundii* GN7391. *J Gen Microbiol* 1980; 121:449-456.
- 565.- Takahashi I, Sawai T, Ando T, Yamagishi S. Cefoxitin resistance by a chromosomal cephalosporinase in *Escherichia coli*. *J Antibiot* 1980; 33:1037-1042.
- 566.- Takahashi I, Tsukamoto K, Harada M, Sawai T. Carbenicillin-hydrolyzing penicillinases of *Proteus mirabilis* and the PSE-type penicillinases of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* 1983; 27: 995-1004.
- 567.- Tenover F. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:82-101.
- 568.- Thabaut A, Acar J, Allouch P, Arlet G, Berardi-Grassias L, Bergogne-Bérézin E, Brun-Buisson Y, Chabanon G, Cluzel R, Courtieu A, Dabernat H, Duval J, Fleurette J, Jarlier V, Meyran M, Monteil H, Nevot P, Petithory C, Philippon A, Reverdy E, Reynaud A, Sedallian A, Sirot J, Wernerburg B. Fréquence et distribution des betalactamases chez 1792 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées en France entre 1985 et 1988. *Pathol Biol* 1990; 38:459-463.
- 569.- Thomson CJ, Amyes SGB. TRC-1: Emergence of a clavulanic acid-resistant TEM  $\beta$ -lactamase in clinical strain. *FEMS Microbiology Letters* 1992; 91:113-118.
- 570.- Thomson CJ, Amyes SGB. Effect of amoxycillin challenge on the  $\beta$ -lactamase TRC-1. 6th ECCMID 1993. Libro de resúmenes, resumen 480, pp. 150.
- 571.- Thomson CJ, Amyes SGB. Selection of the TEM-1  $\beta$ -lactamase, encoded by a plasmid of clinical origin, with increased resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:655-664.
- 572.- Thomson KS, Mejglo ZA, Pearce GN, Regan TJ. 3-dimensional susceptibility testing of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13:45-54.
- 573.- Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional test. *Antimicrobial Agents Chemother* 1992; 36:1877-1882.
- 574.- Thomson KS, Sanders CC, Washington II JA. High-level resistance to cefotaxime and ceftazidime in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1001-1003.
- 575.- de la Torre MG, Romero-Vivas J, Martínez-Beltrán J, Guerrero A, Messeguer M, Bouza E. *Klebsiella* bacteremia: An analysis of 100 episodes. *Rev Infect Dis* 1985; 7:143-150.
- 576.- Traub WH, Bauer D. Outer membrane protein alteration in *Serratia marcescens* resistant against aminoglycoside and  $\beta$ -lactam antibiotics. *Chemotherapy* 1987; 33:172-176.
- 577.- Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Mentis AF, Tsakris A. Identification of a novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 645-654.

- 578.- Urban CM, Meyer KS, Mariano N, Rahal JJ, Flamm R, Bush K. Ceftazidime resistant *Klebsiella pneumoniae* producing a  $\beta$ -lactamase similar to TEM-10. 31st ICAAC 1991; Libro de resúmenes, resumen 1008, p. 267.
- 579.- Van de Klundert JA, Van Gestel MH, Meerdink G, de Marie S. Emergence of bacterial resistance to cefamandol in vivo due to outer membrane protein deficiency. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7:766-778.
- 580.- Van de Klundert JAM, Van Gestel MH, Van Doorn E, Mouton RP. Disc diffusion test for the determination of semi-quantitative substrate profiles of  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Agents 1986; 17:471-479.
- 581.- Varaldo PE, Nicoletti G, Schito GC, Maida A, Facinelli B, Stefani S, Gianrossi G, Murosu E. Circulation in Italy of  $\beta$ -lactamase-producing strains within the major groups of bacterial pathogens. Eur J Epidemiol 1990; 6:287-292.
- 582.- Vatopoulos AC, Philippon A, Tzouveleakis LS, Komninou Z, Legakis NJ. Prevalence of transferable SHV-5 type  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. J Antimicrob Chemother 1990; 26:635-648.
- 583.- Veccoli C, Prevost FE, Ververis JJ, Medeiros AA, O'Leary JR. A comparison of polyacrylamide and agarose gel thin-layer isoelectric focusing for the characterization of  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24:186-189.
- 584.- Vedel G, Belaaouaj A, Gilly L, Labia R, Philippon A, Névot P, Paul G. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI  $\beta$ -lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors. J Antimicrob Chemother 1992; 30:449-462.
- 585.- Vedel G, Mabilat C, Goussard S, Picard B, Fournier G, Gilly L, Paul G, Philippon A. Two variants of transferrable extended-spectrum TEM- $\beta$ -lactamase successively isolated from a clinical *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 1992; 72:161-166.
- 586.- Vedel G, Picard B, Paul G, Philippon A, Gilly L, Krishnamoorthy R, Névot P. Analysis of the molecular relatedness of four extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (SHV-2, SHV-3, SHV-4 and SHV-5) by comparative protein titration curves. J Antimicrob Chemother 1989; 24:9-17.
- 587.- Verbist L. Incidence of multi-resistance in gram-negative bacterial isolates from intensive care units in Belgium: A surveillance study. Scand J Infect Dis 1991; 78 (Suppl):45-53.
- 588.- Vincent S, Glauner B, Gutmann L. Lytic effect of two fluorquinolones, ofloxacin and pefloxacin on *Escherichia coli* W7 and its consequences on peptidoglycan composition. Antimicrobial Agents Chemother 1991; 35:1381-1385.
- 589.- Vu Thien H, Baudon JJ, Rolland M. *Salmonella typhimurium*: résistance aux céphalosporines de troisième génération. Med Mal Infect 1987; 6/7:398-400.
- 590.- Vuye A, Verschraegen G, Claeys G. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to ceftazidime. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:757-761.

- 591.- Walker GC. The SOS response of *Escherichia coli*. En: FC Neidhardt, JL Ingraham, KB Low, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, Vol 2. ASM, Washington 1987, pp. 1346-1357.
- 592.- Walmsley SL, Kitching DA, Low DE, Simor AE, Bruton JL. Novel plasmid-mediated resistance to ceftazidime of clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. Can Med Assoc J 1990; 142:597-598.
- 593.- Wallace Rj, Vance P, Weissfeld A, Martin R.  $\beta$ -lactamases production nad resistance of  $\beta$ -lactam antibiotics in *Nocardia*. Antimicrob Agents Chemother 1978; 14:704-709.
- 594.- Ward LR, Threlfall Es, Rowe B. Multiple drug resistance in salmonellae in England and Wales: a comparison between 1981 and 1988. J Clin Pathol 1990; 43:563-566.
- 595.- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:147-151.
- 596.- Watanabe Y, Yakota T, Higashi Y, Wakai Y, Mine Y. In vitro and in vivo transferable  $\beta$ -lactam resistance to a new plasmid mediated oximinocetoximinocephalosporinase from a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Microbiol Immunol 1991; 35:87-97.
- 597.- Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. Ann Rev Biochem 1983; 52:825-869.
- 598.- Webber DA, Sanders CC. Diverse potential of  $\beta$ -lactamase inhibitors to induce class I enzymes. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:156-158.
- 599.- Webber DA, Sanders CC, Bakken JS, Quinn JP. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. J Infect Dis 1990; 162:460-465.
- 600.- Weisser J, Wiedemann B. Elimination of plasmid by new 4-quinolones. Antimicrob Agent Chemother 1985; 28:700-702.
- 601.- Weisser J, Wiedemann B. Effects of ciprofloxacin on plasmid. Am J Med 1987; 82(Suppl 4A):21-22.
- 602.- Werner V, Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV. Role of  $\beta$ -lactamase and outer membrane proteins in multiple  $\beta$ -lactamase resistance in *Enterobacter cloacae*. Antimicrobial Agents Chemotherapy 1985; 25:455-459.
- 603.- Whitaker S, Hajipieris P, Williams JD. Distribution and types of beta-lactamase among 1,000 gram negative rod bacteria. En: KH Spitzzy, K Karrer (eds). Proceedings of the 13th ICC. Verlag H. Egermann, Viena 1983, Vol 2, PS2-5/1-3, pp. 89/10-1.
- 604.- White PB. Med Res Council of Great Britain. Spec Rep Ser n° 91. 1925.
- 605.- White PB. Med Res Council of Great Britain. Spec Rep Ser n° 103. 1926.
- 606.- Wiedemann B, Atkinson BA. Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends. En: V Lorian (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, Baltimore 1991, pp. 962-1208.

- 607.- Wiedemann B, Kliebe C, Kresken M. The epidemiology of  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989; **24**(Suppl B):1-22.
- 608.- Williams H, King A, Shannon K, Phillips I. Amoxycillin/clavulanate resistant *Escherichia coli*. *Lancet* 1988; **1**:304-305.
- 609.- Williams P, Tomas JM. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Med Microbiol* 1990; **1**: 196-204.
- 610.- Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1989; **2**:378-424.
- 611.- Woodford N, Payne DJ, Johnson AP, Weinbren MJ, Perinpanayagam RM, George RC, Cookson BD, Amyes SGB. Transferable cephalosporin resistance not inhibited by clavulanate in *Escherichia coli*. *Lancet* 1990; **336**:253.
- 612.- Wu SW, Dornbusch K, Göransson E, Ransjö U, Kronvall G. Characterization of *Klebsiella oxytoca* septicaemia isolates resistant to aztreonam and cefuroxime. *J Antimicrob Chemother* 1991; **28**:389-397.
- 613.- Wu SW, Dornbusch K, Norgren M, Kronvall G. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella oxytoca*, not belonging to the TEM or SHV family *J Antimicrob Chemother* 1992; **30**:3-16.
- 614.- Wu PJ, Shannon K, Phillips I.  $\beta$ -lactamases and susceptibility to  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1992; **30**:868-871.
- 615.- Yang Y, Jacoby GA, Livermore DM. LXA-1: a new plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from giving low level resistance. *FEMS Microbiol Lett* 1988; **52**: 97-102.
- 616.- Yang Y, Livermore DM. Activity of temocillin and other penicillins against  $\beta$ -lactamase-inducible and stably derepressed enterobacteria. *J Antimicrob Chemother* 1988; **32**:299-306.
- 617.- Yang Y, Livermore DM. Chromosomal  $\beta$ -lactamase expression and resistance to  $\beta$ -lactam antibiotic in *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**:1385-1391.
- 618.- Yang Y, Livermore DM, Williams RJ. Chromosomal  $\beta$ -lactamase expression and antibiotic resistance in *Enterobacter cloacae*. *J Med Microbiol* 1988; **25**:227-233.
- 619.- Yang Y, Wu P, Livermore DM. Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemoter* 1990; **34**:755-758.
- 620.- Yotsuji A, Minami M, Inoue M, Mitsuhashi S. Properties of novel  $\beta$ -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; **24**:925-929.